

## SUGAR CHAIN COMPOUND AND ITS USE

**Publication number:** JP2001089494

**Publication date:** 2001-04-03

**Inventor:** FUJIO KAZUNARI; YAMAMOTO NAOYUKI; DATE MUTSUHIRO

**Applicant:** WAKO PURE CHEM IND LTD

**Classification:**

- **international:** C07H15/04; A61K39/00; G01N33/53; G01N33/80;  
C07H15/00; A61K39/00; G01N33/53; G01N33/80;  
(IPC1-7): C07H15/04; A61K39/00; G01N33/53

- **european:**

**Application number:** JP19990223177 19990806

**Priority number(s):** JP19990223177 19990806; JP19990203973 19990716

[Report a data error here](#)

### Abstract of JP2001089494

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a sugar chain compound easily bondable with a compound having a group non-reactive with carboxyl group as exclusive group such as protein, enzyme, carrier and pigment without causing steric hindrance, etc., in introduction and keeping the reactivity with an antibody even after the introduction as an antigen. **SOLUTION:** The present invention relates to a sugar chain compound having an optionally substituted amino group bonded through a bivalent hydrocarbon residue, a carrier holding the sugar chain compound in immobilized state, a human serum antigen sensitized particle immobilized with a sugar chain compound containing an antigen site same as the human blood type antigen among the above sugar chain compounds, a reagent for the determination of human blood type containing the sugar chain compound and a method for determining human blood type by using the sugar chain compound as an antigen.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-89494

(P2001-89494A)

(43)公開日 平成13年4月3日(2001.4.3)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

C 07 H 15/04  
A 61 K 39/00  
G 01 N 33/53

識別記号

F I

テマコト<sup>\*</sup>(参考)

C 07 H 15/04  
A 61 K 39/00  
G 01 N 33/53

E 2 G 0 4 5  
H 4 C 0 5 7  
K 4 C 0 8 5  
S

33/80

33/80

審査請求 未請求 請求項の数12 O.L (全37頁)

(21)出願番号

特願平11-223177

(22)出願日

平成11年8月6日(1999.8.6)

(31)優先権主張番号 特願平11-203973

(32)優先日 平成11年7月16日(1999.7.16)

(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 000252300

和光純薬工業株式会社  
大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号

(72)発明者 藤尾 一功

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工  
業株式会社大阪研究所内

(72)発明者 山本 直之

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工  
業株式会社大阪研究所内

(72)発明者 伊達 駿廣

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工  
業株式会社大阪研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 糖鎖化合物及びその用途

(57)【要約】

【課題】 カルボキシル基と反応しない基し  
か有していない蛋白、酵素、担体、色素等の化合物と、  
導入時に立体障害等を起こすことなく、容易に結合し  
得、しかも、導入後もその抗原としての抗体との反応性  
を維持し得る糖鎖化合物の提供。

【解決手段】 二価の炭化水素残基を介して、置  
換基を有していてもよいアミノ基が結合した糖鎖化合  
物、該糖鎖化合物が固定化された担体、該糖鎖化合物の  
うちヒト血液型抗原と同じ抗原部位を含んで成る糖鎖化  
合物が固定化されたヒト血清抗原感作粒子、前記糖鎖化  
合物を含んで成るヒト血液型判定用試薬及び前記糖鎖化  
合物を抗原として用いることを特徴とするヒト血液型の  
判定方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】置換基を有していてもよいアミノ基が二価の炭化水素残基を介して結合した糖鎖化合物。

【請求項2】二価の炭化水素残基がアルキレン基である請求項1に記載の糖鎖化合物。

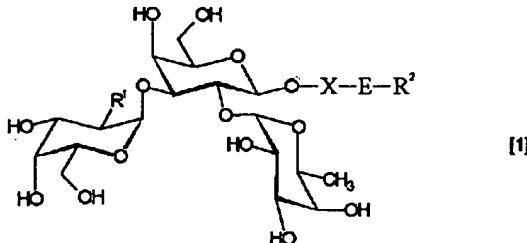
【請求項3】置換基を有していてもよい2～8個の単糖残基から成る糖鎖を含んで成る請求項1に記載の糖鎖化合物。

【請求項4】糖鎖がヒト血液型抗原と同じ抗原部位を含んで成る請求項1に記載の糖鎖化合物。

【請求項5】ヒト血液型抗原がヒトA型抗原又はヒトB型抗原である請求項4に記載の化合物。

【請求項6】糖鎖化合物が一般式 [1]

【化1】



(式中、R<sup>1</sup>は水酸基又は-NHCOCH<sub>3</sub>を表し、R<sup>2</sup>は置換基を有していてもよいアミノ基を表し、Xは結合手又は糖残基を表し、Eは二価の炭化水素残基を表す。)で示されるものである請求項1に記載の化合物。

【請求項7】Eで示される二価の炭化水素残基がアルキレン基である請求項6に記載の糖鎖化合物。

【請求項8】Xで示される糖残基が1～5個の単糖残基から成るものである請求項6に記載の糖鎖化合物。

【請求項9】請求項1に記載の糖鎖化合物が固定化された担体。

【請求項10】請求項4～8の何れかに記載の糖鎖化合物が固定化されたヒト血液型抗原感作粒子。

【請求項11】請求項4～8の何れかに記載の糖鎖化合物を含んで成るヒト血液型判定用試薬。

【請求項12】請求項4～8の何れかに記載の糖鎖化合物を抗原として用いることを特徴とするヒト血液型の判定方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、抗原性を有する糖鎖に二価の炭化水素残基を介して、置換基を有していてもよいアミノ基が結合した糖鎖化合物、及びその用途に関するものである。

【0002】

【従来の技術】近年、糖鎖工学の発展に伴って、複合糖鎖化合物が生物学的に重要な意義を持つことが判ってきている。例えば、血液中の細胞表面に存在するABO式血液型物質やLewis血液型物質等の血液型抗原物質が特定構造を有する糖鎖であるということや、モノクロ

一ナル抗体を用いた免疫学的分析により、癌抗原関連物質が特定の化学修飾を受けた糖鎖化合物であるということ等が明らかになってきた。また、糖鎖化合物の一一種である糖脂質は、抗原としての機能だけでなく細胞接着分子としての機能や細胞発生、血液細胞分化、免疫細胞分化等生体の幅広い生理現象に関与していることも明らかにされている。

【0003】これらの研究を通じ糖鎖化合物は、癌関連研究試薬或いは判定試薬としてだけでなく、血液型抗原をはじめとする各種生体成分の検出材料として注目を集めている。

【0004】現在、糖鎖化合物は、目的に応じて、天然品(生体試料等から精製、抽出されたもの)、半合成品、全合成品等が利用されたり、或いは、適当な蛋白、酵素、担体等に直接的或いはスペーサー等を介する等して間接的に担持された状態で利用されている。

【0005】しかしながら、ABO式血液型裏試験判定に於いて、従来の抗原として、特定のヒト血液型抗原を持つ赤血球を利用した場合には様々な問題点があった。

即ち、ヒト赤血球を抗原担持担体として用いるため、ヒト赤血球がウィルスに感染していると、所謂バイオハザードの問題が生じる可能性があり、また、ヒト赤血球は試薬としての安定性が十分でないといったことがそれである。

【0006】そこで、上記問題点を解決すべく、ラテックス、酵母菌体或いはゼオライト粒子等の担体に、赤血球由来の糖鎖抗原或いは合成糖鎖抗原を物理的吸着によって担持させて赤血球の代わりに用いることによりウィルスによる影響を回避するといった研究が行われたが  
30 (荻原 淳嘉、総合臨床14、445(1965)、実繁幸男、第27回日本輸血学会要旨集、特開昭60-40958号公報等)、このような物理的吸着による担持方法で得られた抗原では、担体からの抗原の解離が起こりやすい為、安定性の点で問題がある。

【0007】この問題を解決する手段として、反応性官能基による化学結合を利用して抗原を担体に担持させるという試みがなされた(特開昭63-241357号公報等)。

このような、反応性官能基を導入した糖鎖化合物の例としては、例えばカルボキシル基、アルコキシカルボニル基等を導入した糖鎖誘導体(USP4137401、USP4238473等)が知られているが、これら反応性官能基がカルボキシル基タイプのものは、担体がアミノ基、チオール基、ヒドロキシル基、イソシアネート基又はハロゲン化アルキル基を有するものであれば直接反応させて担持させることができるもの、担体が、例えばカルボキシル基、アルコキシカルボニル基、アシルオキシカルボニル基、ハロホルミル基、クロロスルホニル基、シアネート基、エポキシ基、ケトン基、アルデヒド基等のようなカルボキシル基とは反応しない基しか有していない場合には、ジアミン等を反応させてアミノ基を導入してから担体と

結合させるといった煩雑な操作が必要となる。

【0008】尤も、この様な方法によりアミノ基を導入しても、アミノ基と抗原である糖鎖との距離がそれ程離れていないので、立体障害により担体への導入が妨げられたり、リボソームを担体として用いた場合に、導入後に抗原活性を維持できない等の問題が生じることもあった。更に、 $\alpha$ -フェトプロテインやルイス抗原等の重要な構成因子となっているシアル酸残基等に由来するカルボキシル基をその分子中に有する糖鎖誘導体では、多段階を要するカルボキシル基の選択的保護を行わなければ、反応性官能基の導入及び蛋白、酵素、担体或いは色素との反応を選択的に行うことができないという問題もあった。

#### 【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記した如き状況に鑑みされたもので、カルボキシル基と反応しない基しか有していない蛋白、酵素、担体、色素等の化合物と、導入時に立体障害等を起こすことなく、容易に結合し得、しかも、導入後もその抗原としての抗体との反応性を維持し得る糖鎖化合物を提供することを目的とする。

#### 【0010】

【課題を解決するための手段】本発明は、下記構成から成る。

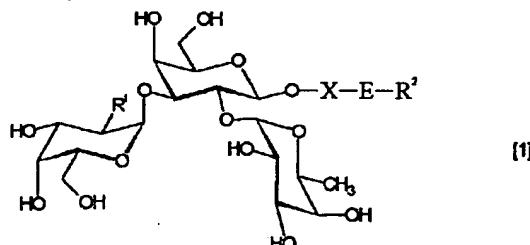
(1)二価の炭化水素残基を介して、置換基を有していてもよいアミノ基が結合した糖鎖化合物。(以下、本発明の糖鎖化合物と略記する場合がある。)

(2)糖鎖がヒト血液型抗原と同じ抗原部位を含んで成る(1)に記載の糖鎖化合物。

(3)一般式[1]

#### 【0011】

#### 【化2】



【0012】(式中、R<sup>1</sup>は水酸基又は-NHCOOCH<sub>3</sub>を表し、R<sup>2</sup>は置換基を有していてもよいアミノ基を表し、Xは結合手又は糖残基を表し、Eは二価の炭化水素残基を表す。)で示される(1)に記載の糖鎖化合物。

(4)(1)に記載の糖鎖化合物が固定化された担体。

(5)(2)に記載の糖鎖化合物又は(3)に記載の糖鎖化合物が固定化されたヒト血清抗原感作粒子。

(6)(2)に記載の糖鎖化合物又は(3)に記載の糖鎖化合物を含んで成るヒト血液型判定用試薬。

(7)(2)に記載の糖鎖化合物又は(3)に記載の糖鎖化合物を抗原として用いることを特徴とするヒト血液型の判定

方法。

【0013】即ち、本発明者等は、バイオハザードの問題等が無く、試薬として安定であり、且つカルボキシル基と反応しない基しか持たない担体等と容易に化学結合し得る糖鎖化合物を開発すべく鋭意研究を行った結果、二価の炭化水素残基を介して、置換基を有していてもよいアミノ基が結合した糖鎖化合物が上記した如き特徴を全て兼ね備えていることを見出し本発明を完成するに至った。

- 10 【0014】本発明の糖鎖化合物は、例えば下記一般式[2]  
【0015】  
【化3】



【0016】(式中、Eは二価の炭化水素残基を表し、R<sup>2</sup>は置換基を有していてもよいアミノ基を表す。)で示される基と、2個以上の単糖残基から成る糖鎖化合物の酸素原子とが結合したものである。

- 20 【0017】一般式[2]に於いて、Eで表される二価の炭化水素残基としては、通常炭素数1~20、好ましくは2~10、更に好ましくは3~8の例えば二価の脂肪族炭化水素残基、二価の脂環式炭化水素残基、二価の脂環脂肪族炭化水素残基、二価の芳香族残基、二価の芳香脂肪族残基等、が挙げられ、これら二価の炭化水素残基は、その鎖中に、例えば酸素原子、硫黄原子、窒素原子等のヘテロ原子を1~3個有していてもよい。

- 【0018】二価の脂肪族炭化水素残基としては、例えば飽和脂肪族炭化水素残基及び不飽和脂肪族炭化水素残基が挙げられる。

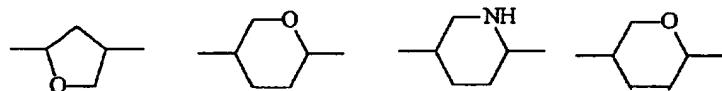
- 30 【0019】飽和脂肪族炭化水素残基としては、直鎖状でも分枝状でもよく、具体的には、例えばメチレン基、エチレン基、トリメチレン基、プロピレン基、テトラメチレン基、2-メチルプロピレン基、ペントメチレン基、2-メチルブチレン基、2-エチルプロピレン基、ヘキサメチレン基、2-エチルブチレン基、ヘプタメチレン基、2-エチルベンチル基、2-メチルヘキシレン基、オクタメチレン基、2-エチルヘキシレン基、ノナメチレン基、デカメチレン基、ウンデカメチレン基、ド

- 40 デカメチレン基、テトラデカメチレン基、ヘキサデカメチレン基、オクタデカメチレン基、2-エチルオクタデセン基、イコセン基等のアルキレン基、例えば上記アルキレン基の鎖中に例えば酸素原子、硫黄原子、窒素原子等のヘテロ原子を有して成る例えば-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-等が挙げられる。

- 【0020】不飽和脂肪族炭化水素残基としては、上記の如き飽和脂肪族炭化水素残基の鎖中に1~3個の二重結合を有しているものが挙げられ、これらは直鎖状でも分枝状でもよく、具体的には、例えば-CH=CH-、-CH<sub>2</sub>CH=

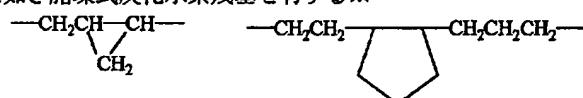
$\text{CH}_2$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2$ 等が挙げられる。

【0021】二価の脂環式炭化水素残基としては、単環でも多環でもよく、また、二重結合を有していてもよく、具体的には、例えばシクロプロピレン基、1,3-シクロペンチレン基、1,4-シクロヘキシレン基、1,2-シクロ\*



【0023】等が挙げられる。

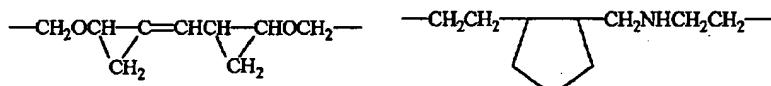
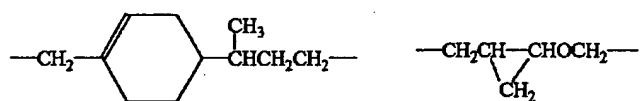
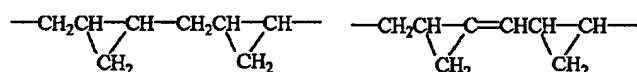
【0024】二価の脂環脂肪族炭化水素残基としては、上記した如き飽和又は不飽和脂肪族炭化水素残基の鎖中或いは末端に上記した如き脂環式炭化水素残基を有する※



※基が挙げられ、具体的には、例えば

【0025】

【化5】



【0026】等が挙げられる。

【0027】二価の芳香族残基としては、単環でも多環でもよく、また、環と環との間に結合手を介してもよく、具体的には、例えばo-フェニレン基、p-フェニレン基、m-フェニレン基、1,5-ナフチレン基、2,6-ナフチレン基、ビフェニル-4,4'-イレン基、1,5-アントリレン基、2,6-アントリレン基、p-テルフェニル-4,4'-イレン基、m-テルフェニル-4,4'-イレン基、2,7-フェナントリ

レン基、1,6-ビレニレン基等が挙げられる。

【0028】二価の芳香脂肪族残基としては、上記した如き飽和又は不飽和脂肪族炭化水素残基の鎖中或いは末端に、上記した如き二価の芳香族残基を1~3個有しているものが挙げられ、具体的には、例えば

【0029】

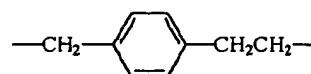
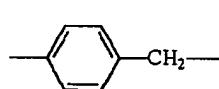
【化6】

\* ヘキシレン基、1,3-シクロヘキシレン基、3-シクロヘキセン-1,2-イレン基、2,5-シクロヘキサジエン-1,4-イレン基、1,4-シクロヘプチレン基、1,4-シクロオクチレン基、2,7-スピロ[3,4]オクチレン基、3,9-スピロ[4,5]デカ-1,6-ジエニレン基、

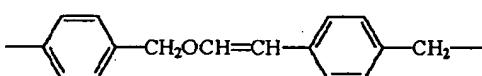
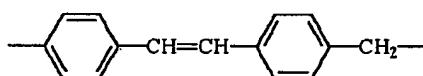
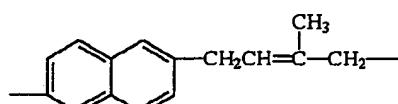
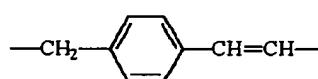
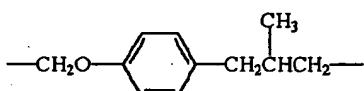
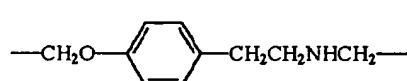
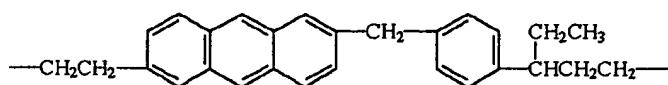
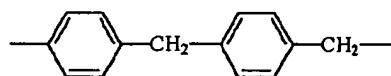
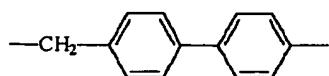
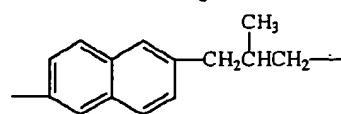
【0022】

【化4】

7



8



【0030】等が挙げられる。

【0031】R<sup>2</sup>で示される、置換基を有していてもよいアミノ基の置換基としては、例えばアルキル基、ハロアルキル基、アリール基、縮合多環式炭化水素の脂肪族環から水素原子を1個除いてできる1価基、アリールアルキル基、アシル基、ハロゲン化アシル基、アルコキシカルボニル基、ハロゲン化アルコキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基、アリールアルキルオキシカルボニル基、縮合多環式炭化水素の脂肪族環から水素原子を1個除いてできる1価基を置換基として有するアルキルオキシカルボニル基、アシルオキシ基、例えばアルキレン基、ハロゲン化アルキレン基、アリーレン基、ジアシル基、ハロゲン化ジアシル基、アルキレンジオキシカルボニル基、アリーレンジオキシカルボニル基、ジアシルオキシ基等アミノ基の2つの水素原子を同時に置換し得る二価の基、アミノ酸残基、ペプチド残基等が挙げられる。尚、該アミノ基が2個の置換基を有する場合、それら置換基は同一でも異なっていてもよい。

【0032】尚、本発明の糖鎖化合物をヒト血液型判定用抗原として用いる場合には、アミノ基の置換基として

は、例えばアルキル基、ハロアルキル基、アリール基、縮合多環式炭化水素の脂肪族環から水素原子を1個除いてできる1価基、アリールアルキル基、アシル基、ハロゲン化アシル基、アルコキシカルボニル基、ハロゲン化アルコキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基、アリールアルキルオキシカルボニル基、縮合多環式炭化水素の脂肪族環から水素原子を1個除いてできる1価基を置換基として有するアルキルオキシカルボニル基、アシルオキシ基、例えばアルキレン基、ハロゲン化アルキレン基、アリーレン基、ジアシル基、ハロゲン化ジアシル基、アルキレンジオキシカルボニル基、アリーレンジオキシカルボニル基、ジアシルオキシ基等アミノ基の2つの水素原子を同時に置換し得る二価の基等が好ましい。また、本発明の糖鎖化合物を抗体製造用の免疫源として用いる場合には、アミノ基の置換基としては、脂肪酸由来のアシル基、アミノ酸残基、ペプチド残基等が好ましく、更にまた、本発明の糖鎖化合物をリボソーム調製用原料として用いる場合には、アミノ基の置換基としては、脂肪酸由来のアシル基等が挙げられる。

【0033】アルキル基としては、直鎖状でも分枝状で

も或いは環状でもよく、通常炭素数1～20、好ましくは1～10のものが挙げられ、具体的には、例えばメチル基、エチル基、n-プロビル基、イソプロビル基、n-ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、n-ベンチル基、イソベンチル基、sec-ベンチル基、tert-ベンチル基、ネオベンチル基、2-メチルブチル基、1-エチルブロビル基、2-エチルブロビル基、n-ヘキシル基、イソヘキシル基、n-ヘブチル基、n-オクチル基、n-ノニル基、n-デシル基、n-ドデシル基、n-テトラデシル基、n-ペントデシル基、n-ヘプタデシル基、n-ノナデシル基、n-イコシル基、シクロプロビル基、シクロベンチル基、シクロヘキシル基、シクロベンタデシル基、シクロノナデシル基等が挙げられる。

【0034】ハロアルキル基としては、上記の如きアルキル基の一個以上の水素原子が例えば塩素、フッ素、臭素等のハロゲン原子で置換されているものが挙げられ、具体的には、例えばクロロメチル基、ジクロロメチル基、トリクロロメチル基、トリフルオロメチル基、ジブロモメチル基、1,1,2,2-テトラクロロエチル基、4,4,4,4-トリフルオロブチル基、バーフルオロn-ベンチル基、バーフルオロn-ヘキシル基、10,10,10-トリクロロデシル基、バーフルオロn-ノナデシル基、バーフルオロn-イコシル基等が挙げられる。

【0035】アルキレン基としては、上記の如きアルキル基が二価となった通常炭素数2～20、好ましくは2～10の基等が挙げられ、例えばエチレン基、トリメチレン基、プロピレン基、テトラメチレン基、2-メチルプロピレン基、ベンタメチレン基、2-メチルブチレン基、2-エチルプロピレン基、ヘキサメチレン基、2-エチルブチレン基、ヘプタメチレン基、2-エチルベンチル基、2-メチルヘキシレン基、オクタメチレン基、2-エチルヘキシレン基、ノナメチレン基、デカメチレン基、ウンデカメチレン基、ドекアメチレン基、テトラデカメチレン基、ヘキサデカメチレン基、オクタデカメチレン基、2-エチルオクタデセン基、イコセン基等が挙げられる。

【0036】ハロゲン化アルキレン基としては、上記の如きアルキレン基の一個以上の水素原子が例えば塩素、フッ素、臭素等のハロゲン原子に置換されたものが挙げられ、具体的には、例えばクロロメチレン基、ジブロモメチレン基、1,2-ジクロロエチレン基、2-(2,2,2-トリクロロエチル)-ヘキシレン基、バーフルオロデカメチレン基、2-(1,1,2,2,2-ベンタフルオロエチル)-オクタデセン基、バーフルオロイコセン基等が挙げられる。

【0037】アリール基としては、単環でも多環でもよく、また上記した如きアルキル基又はニトロ基を置換基として有していてもよく、具体的には、例えばフェニル基、p-ニトロフェニル基、o-トリル基、m-トリル基、p-トリル基、4-ニトロ-o-トリル基、4-ニトロ-m-トリル基、2,3-キシリル基、3,5-キシリル基、5-ニトロ-2,3-

キシリル基、メシチル基、m-クメニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基、1-アントリル基、2-アントリル基、1-フェナントリル基、2-フェナントリル基、3-フェナントリル基、4-フェナントリル基、9-フェナントリル基、1-ビレニル基等が挙げられる。

【0038】縮合多環式炭化水素の脂肪族環から水素原子を1個除いてできる1価基としては、例えば炭素数8～20のものが挙げられ、具体的には、例えば1-インデニル基、2-インデニル基、1-アセナフテニル基、9-フルオレニル基、1-フェナレニル基等が挙げられる。

【0039】アリールアルキル基としては、上記の如きアルキル基の水素原子1個以上が上記の如きアリール基に置換されたものが挙げられ、具体的には、例えばベンジル基、ベンズヒドリル基、フェネチル基、トリチル基等が挙げられる。

【0040】アリーレン基としては、上記の如きアリール基が二価の基になったもの等が挙げられ、具体的には、例えばo-フェニレン基、m-フェニレン基、p-フェニレン基、o-3-トリレン基、m-2-トリレン基、m-4-トリレン基、m-5-トリレン基、p-2-トリレン基、o-3,4-キシリレン基、o-3,6-キシリレン基、o-4,5-キシリレン基、p-2,3-キシリレン基、p-2,6-キシリレン基、メシチレン基、o-3-クメニレン基、o-4-クメニレン基、m-5-クメニレン基、p-クメニレン基、2,3-ナフチレン基、1,4-ナフチレン基、2,7-ナフチレン基、2,6-ナフチレン基、1,8-ナフチレン基、1,5-ナフチレン基、1,8-アントリレン基、2,7-アントリレン基、2,6-アントリレン基、1,5-アントリレン基、1,4-アントリレン基、2,3-アントリレン基、2,7-フェナントリレン基、3,6-フェナントリレン基、4,5-フェナントリレン基、9,10-フェナントリレン基等が挙げられる。

【0041】アシル基としては、モノカルボン酸由来の炭素数2～24の例えばアセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、バレリル基、イソバレリル基、ビパロイル基、ヘプタノイル基、オクタノイル基、ノナノイル基、デカノイル基、ラウロイル基、トリデカノイル基、ミリストイル基、ベンタデカノイル基、バルミトイール基、ヘプタデカノイル基、ステアロイル基、ノナデカノイル基、イコサノイル基、ヘニコサノイル基、ドコサノイル基、トリコサノイル基、テトラコサノイル基、ベンゾイル基、トルオイル基、ヒドロアトロポイル基、2-ナフトイル基等のアシル基等が挙げられる。

【0042】尚、本発明の糖鎖化合物を抗体製造用の免疫源、或いはリボソーム調製用原料として用いる場合、アミノ基の置換基として挙げられる脂肪酸由来のアシル基としては、例えば炭素数12～24、好ましくは14～20のものが挙げられ、具体的には、例えばラウロイル基、トリデカノイル基、ミリストイル基、ベンタデカノイル基、バルミトイール基、ヘプタデカノイル基、ステ

11

アロイル基、ノナデカノイル基、イコサノイル基、ヘニコサノイル基、ドコサノイル基、トリコサノイル基、テトラコサノイル基等が挙げられる。

【0043】ジアシル基としては、ジカルボン酸由来の炭素数2～20の例えばマロニル基、スクシニル基、グルタリル基、アジポイル基、ヘブタンジオイル基、オクタンジオイル基、ノナンジオイル基、デカンジオイル基、フタロイル基、イソフタロイル基、テレフタロイル基等が挙げられる。

【0044】ハロゲン化アシル基としては、上記した如きアシル基の水素原子の1個以上が例えば塩素、フッ素、臭素等のハロゲン原子に置換されたものが挙げられ、具体的には、例えばトリフルオロアセチル基、トリクロロアセチル基、トリプロモアセチル基、3,3,3-トリクロロプロピオニル基、バーフルオロプロピオニル基、3,3,4,4-テトラクロロブチリル基、バーフルオロオクタノイル基、9,9,10,10,10-ペンタクロロデカノイル基、バーブロモミリストイル基、バーフルオロステアロイル基等が挙げられる。

【0045】ハロゲン化ジアシル基としては、上記した如きジアシル基の水素原子の1個以上が例えば塩素、フッ素、臭素等のハロゲン原子に置換されたものが挙げられ、具体的には、例えば2,2-ジクロロマロニル基、2,3-ジプロモスクシニル基、4,4-ジフルオロヘブタンジオイル基、バーフルオロデカンジオイル基等が挙げられる。

【0046】アルコキシカルボニル基としては、例えば炭素数2～11のものが挙げられ、具体的には、例えばメトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、プロピルオキシカルボニル基、n-ブトキシカルボニル基、sec-ブトキシカルボニル基、tert-ブトキシカルボニル基、n-ベンチルオキシカルボニル基、n-ヘキシルオキシカルボニル基、n-ヘプチルオキシカルボニル基、2-エチルヘキシルオキシカルボニル基、n-オクチルオキシカルボニル基、n-ノニルオキシカルボニル基、n-デシルオキシカルボニル基等が挙げられる。

【0047】ハロゲン化アルコキシカルボニル基としては、上記の如きアルコキシカルボニル基の1個以上の水素原子が塩素、フッ素、臭素等のハロゲン原子に置換されたものが挙げられ、具体的には、例えはトリクロロメトキシカルボニル基、2,2,2-トリクロロエトキシカルボニル基、バーフルオロプロピルオキシカルボニル基、バーフルオロブトキシカルボニル基、5,5,5-トリクロロベンチルオキシカルボニル基、8,8,8-トリフルオロオクチルオキシカルボニル基、バーフルオロデシルオキシカルボニル基等が挙げられる。

【0048】アルキレンジオキシカルボニル基としては、例えば炭素数3～12のものが挙げられ、具体的には、例えはメチレンジオキシカルボニル基、エチレンジオキシカルボニル基、トリメチレンジオキシカルボニル基、プロピレンジオキシカルボニル基、テトラメチレン

12

ジオキシカルボニル基、3-メチルプロピレンジオキシカルボニル基、2-メチルブチレンジオキシカルボニル基、2,3-ジメチルプロピレンジオキシカルボニル基、3-エチルプロピレンジオキシカルボニル基、ヘキサメチレンジオキシカルボニル基、ヘプタメチレンジオキシカルボニル基、オクタメチレンジオキシカルボニル基、ノナメチレンジオキシカルボニル基、デカメチレンジオキシカルボニル基等が挙げられる。

【0049】アリールオキシカルボニル基としては、例えば炭素数6～20のものが挙げられ、具体的には、例えはフェニルオキシカルボニル基、o-トリルオキシカルボニル基、m-トリルオキシカルボニル基、p-トリルオキシカルボニル基、2,3-キシリルオキシカルボニル基、2,4-キシリルオキシカルボニル基、3,5-キシリルオキシカルボニル基、1-ナフチルオキシカルボニル基、2-ナフチルオキシカルボニル基、1-アントリルオキシカルボニル基、2-アントリルオキシカルボニル基、1-フェナントリルオキシカルボニル基、2-フェナントリルオキシカルボニル基、3-フェナントリルオキシカルボニル基、4-フェナントリルオキシカルボニル基、9-フェナントリルオキシカルボニル基等が挙げられる。

【0050】アリールアルキルオキシカルボニル基としては、上記の如きアルキルオキシカルボニル基の1個以上の水素原子が上記した如きアリール基に置換されたものが挙げられ、具体的には、例えはベンジルオキシカルボニル基、p-ニトロベンジルオキシカルボニル基、ベンズヒドリルオキシカルボニル基、フェネチルオキシカルボニル基、トリチルオキシカルボニル基等が挙げられる。

【0051】縮合多環式炭化水素の脂肪族環から水素原子を1個除いてできる1価基を置換基として有するアルキルオキシカルボニル基としては、上記の如きアルキルオキシカルボニル基の1個以上の水素原子が上記の如き縮合多環式炭化水素の脂肪族環から水素原子を1個除いてできる1価基に置換されたものが挙げられ、具体的には、例えは1-インデニルメチルオキシカルボニル基、2-インデニルエチルオキシカルボニル基、1-アセナフテニルエチルオキシカルボニル基、1-フェナレニルメチルオキシカルボニル基、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基等が挙げられる。

【0052】アミノ酸残基としては、アミノ酸の末端カルボキシル基から-OH基を除いた基を意味し、具体的には、例えはアラニン残基、アルギニン残基、アスパラギン残基、アスパラギン酸残基、システイン残基、システイン残基、グルタミン酸残基、グルタミン残基、グリシン残基、ヒスチジン残基、イソロイシン残基、ロイシン残基、n-ロイシン残基、リシン残基、メチオニン残基、フェニルアラニン残基、プロリン残基、セリン残基、スレオニン残基、トリプトファン残基、チロシン残基、バリン残基等が挙げられる。

【0053】ペプチド残基としては、直鎖状でも分枝状でもよく、通常アミノ酸残基2～100個、好ましくは2～50個から成るのが挙げられる。

【0054】糖鎖を構成する单糖残基としては、单糖分子から末端OH基の水素原子の1～5個、好ましくは1～3個を除いたものを意味し、例えばトレオース残基、エリトロース残基、エリトルロース残基等のテトロース残基類、例えばリボース残基、デオキシリボース残基、アラビノース残基、キシロース残基、リキソース残基、リブロース残基、キシリロース残基、アラビヌロース残基、リクスロース等のベントース残基類、例えばグルコース残基、マンノース残基、アロース残基、アルトロース残基、ガラクトース残基、タロース残基、イドース残基、グロース残基、フコース残基、フルクトース残基、ソルボース残基、タガトース残基、ブシコース残基等のヘキソース残基類、例えばグルコサミン残基、ガラクロサミン残基、N-アセチルグルコサミン残基、N-アセチルガラクトサミン残基、N-アセチルムラミン酸残基等のアミノ糖残基類、例えばN-アセチルイノシン酸残基等のシアル酸残基類、例えばソルビトール残基、イノシトール残基、マンニトール残基、リビトール残基、エリトリトール残基、アラビトール残基、キシリトール残基等の糖アルコール残基類等が挙げられ、これら单糖残基はそれらの持つ-OHの1個以上が-OR'の形に成っていてもよく、また、单糖残基の2つの-OHが、互いに結合して-O-R"-O-の形に成っていてもよい。

【0055】R'としては、通常糖の水酸基の水素原子を置換し得るもの（例えば水酸基の保護基として用いられるもの）であれば如何なるものでもよいが、例えばアルキル基、アリール基、置換基を有していてもよいベンジル基、アシル基、ハロゲン化アシル基、アシルアルキルカルボニル基、ベンジリデン基、イソプロピリデン基、トリメチルシリル基、tert-ブチルジメチルシリル基、-CH<sub>2</sub>(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-NHCO-O-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>、-CO-O-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(2Br)等が挙げられる。

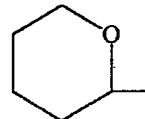
【0056】R"としては、例えばメチレン基、エチレン基、トリメチレン基、プロビレン基、テトラメチレン基、2-メチルプロビレン基、ペンタメチレン基、2-メチルブチレン基、2-エチルブチレン基、ヘキサメチレン基、2-エチルブチレン基、ヘプタメチレン基、2-エチルベンチル基、2-メチルヘキシレン基、オクタメチレン基、2-エチルヘキシレン基、ノナメチレン基、デカメチレン基、ウンデカメチレン基、ドデカメチレン基、テトラデカメチレン基、ヘキサデカメチレン基、オクタデカメチレン基、2-エチルオクタデセン基、イコセン基等の通常炭素数1～20、好ましくは1～10の直鎖状でも分枝状でもよいアルキレン基、例えばフェニルメチレン基、フェニルエチレン基、1-フェニルトリメチレン基、2-フェニルトリメチレン基、1-フェニルテトラメチレン基、2-フェニルテトラメチレン基、

1,4-ジフェニルテトラメチレン基、1-フェニルベンタメチレン基、2-フェニルベンタメチレン基、3-フェニルベンタメチレン基、1,5-ジフェニルベンタメチレン基、ベンジルメチレン基、ベンジルエチレン基、1-ベンジルトリメチレン基、2-ベンジルトリメチレン基、1-ベンジルテトラメチレン基、1-ベンジル-4-フェニルテトラメチレン基、2-ベンジルテトラメチレン基、1-ベンジルベンタメチレン基、1-ベンジル-5-フェニルベンタメチレン基、2-ベンジルベンタメチレン基、3-ベンジルベンタメチレン基等の、上記アルキレン基の1個以上の水素原子が芳香環で置換された基等が挙げられる。

【0057】アルキル基としては、直鎖状でも分枝状でも或いは環状でもよく、例えば酸素原子、硫黄原子、窒素原子等のヘテロ原子を1～3個有していてもよく、具体的には、炭素数1～10の例えばメチル基、エチル基、n-ブロビル基、イソブロビル基、n-ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、n-ベンチル基、イソベンチル基、sec-ベンチル基、tert-ベンチル基、ネオベンチル基、n-ヘキシル基、イソヘキシル基，20 シクロヘキシル基，

【0058】

【化7】



【0059】n-ヘプチル基、シクロヘプチル基等が挙げられる。

【0060】アリール基としては、单環でも多環でもよく、また上記した如きアルキル基又はニトロ基を置換基として有していてもよく、具体的には、例えばフェニル基、p-ニトロフェニル基、2,4-ニトロフェニル基、o-トリル基、m-トリル基、p-トリル基、4-ニトロ-o-トリル基、4-ニトロ-m-トリル基、2,3-キシリル基、3,5-キシリル基、5-ニトロ-2,3-キシリル基、メシチル基、m-クメニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基、1-アントリル基、2-アントリル基、1-フェナントリル基、2-フェナントリル基、3-フェナントリル基、4-フェナントリル基、9-フェナントリル基、1-ビレニル基等が挙げられる。

【0061】置換基を有していてもよいベンジル基としては、例えばニトロベンジル基、-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(2NO<sub>2</sub>)、-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(2,6Cl<sub>2</sub>)、-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(3Br)，アジドベンジル基、メトキシベンジル基等が挙げられる。

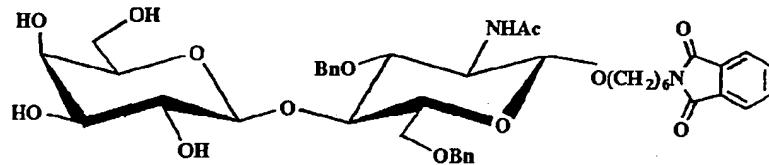
【0062】アシル基としては、モノカルボン酸由來の炭素数2～24の例えばアセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、バレリル基、イソバレリル基、ビパロイル基、ヘプタノイル基、オクタノイル基、ノナノイル基、デカノイル基、ラウロイル基、トリデカノイル基、ミリストイル基、ベンタデカノイル基、50 パルミトイ基、ヘプタデカノイル基、ステアロイル

15

基、ノナデカノイル基、イコサノイル基、ヘニコサノイル基、ドコサノイル基、トリコサノイル基、テトラコサノイル基、ベンゾイル基、トルオイル基、ヒドロアトロボイル基、2-ナフトイル基等が挙げられる。

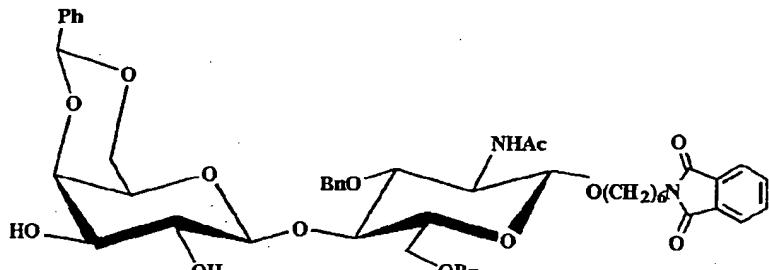
【0063】ハロゲン化アシル基としては、上記した如きアシル基の水素原子の1個以上が例えば塩素、フッ素、臭素等のハロゲン原子に置換されたものが挙げられ、具体的には、例えばトリフルオロアセチル基、トリクロロアセチル基、トリプロモアセチル基、3,3,3-トリクロロプロピオニル基、バーフルオロプロピオニル基、3,3,4,4-テトラクロロブチリル基、バーフルオロオクタノイル基、9,9,10,10,10-ペンタクロロデカノイル基、バープロモリストイル基、バーフルオロステアロイル基等が挙げられる。

【0064】アシルアルキルカルボニル基としては、例\*



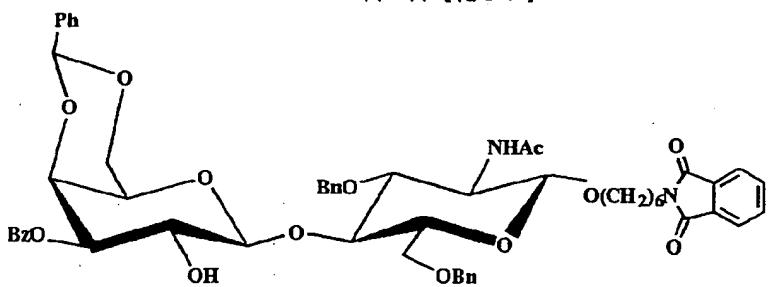
【0068】

※ ※ 【化9】



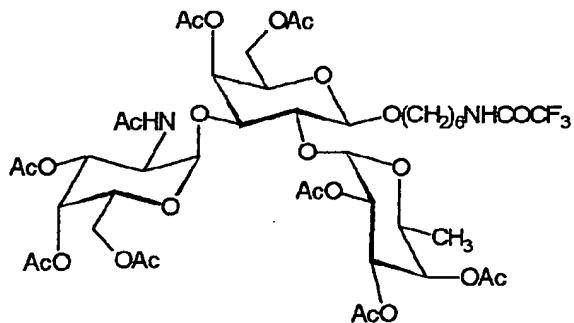
【0069】

★ ★ 【化10】



【0070】

☆40☆ 【化11】



16

\* えばアセチルメチルカルボニル基、アセチルエチルカルボニル基、アセチルトリメチルカルボニル基、アセチルプロピルカルボニル基、プロピオニルメチルカルボニル基、プロピオニルエチルカルボニル基、プロピオニルブロピルカルボニル基、ブチリルメチルカルボニル基、ブチリルエチルカルボニル基等が挙げられる。

【0065】本発明の糖鎖化合物に係る糖鎖は、同一でも異なっていてもよい通常2個以上、好ましくは2~8個、更に好ましくは3~6個の先に説明した単糖残基が夫々O-グリコシド結合によって結合して形成されたものである。

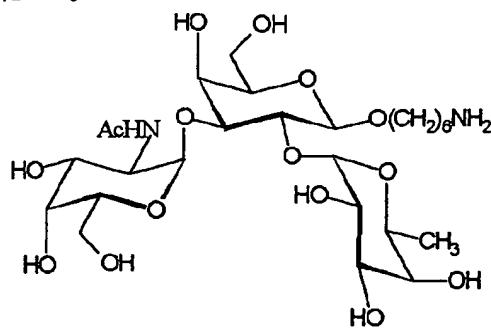
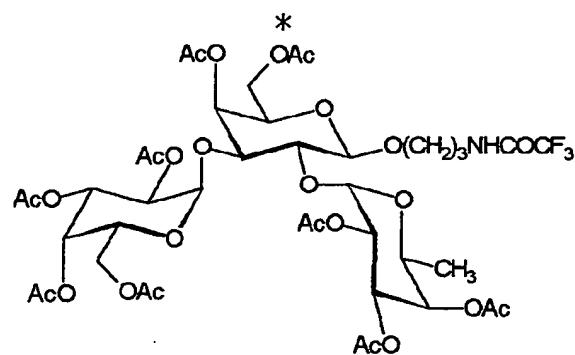
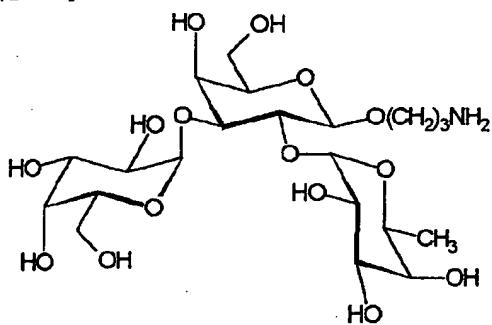
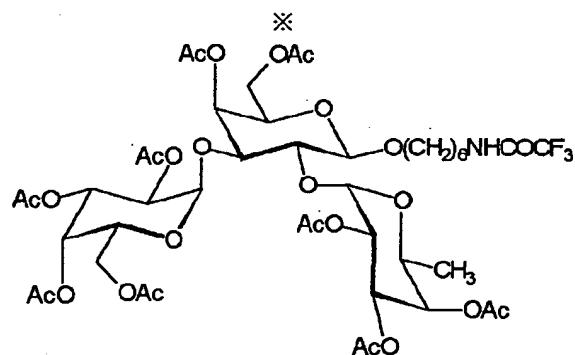
【0066】本発明の糖鎖化合物の具体例としては、例えば

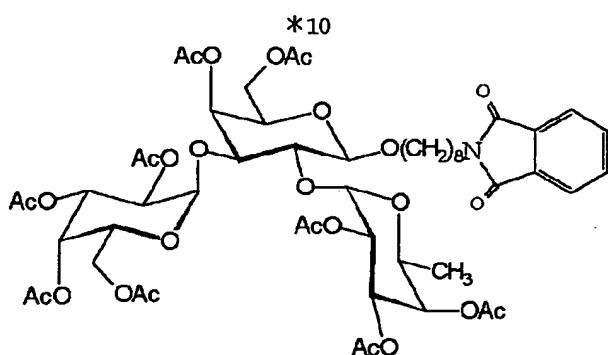
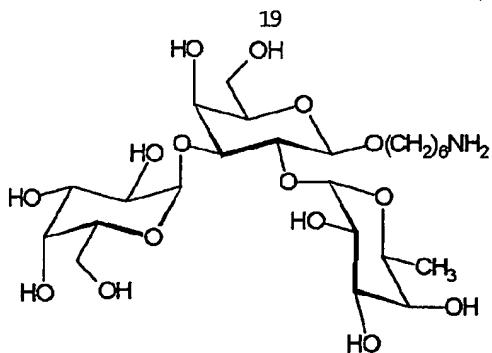
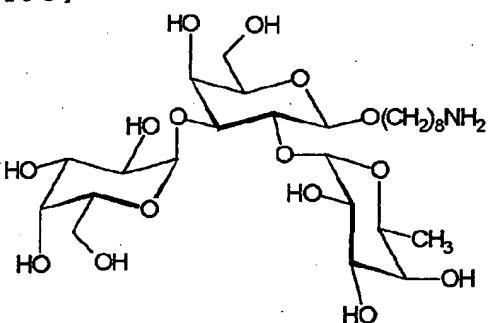
【0067】

【化8】

17

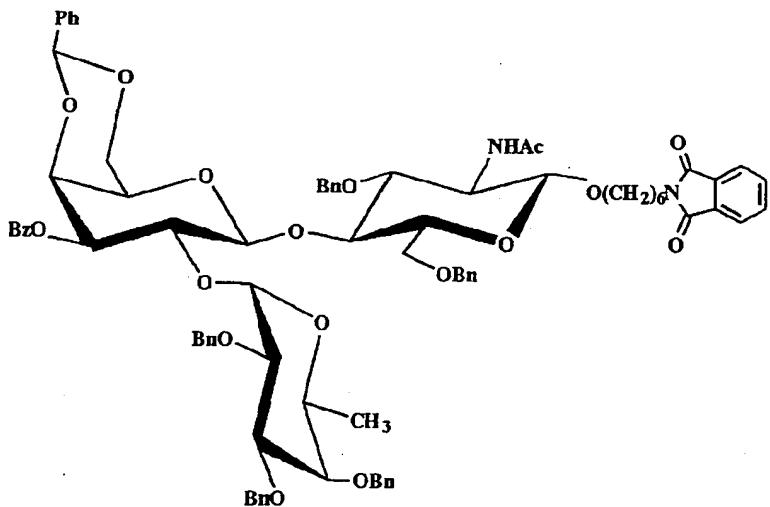
18

【0071】  
【化12】\*【0072】  
【化13】【0073】  
【化14】※【0074】  
【化15】【0075】  
【化16】

\* [0076]  
[化17][0077]  
[化18]※ [0078]  
[化19]

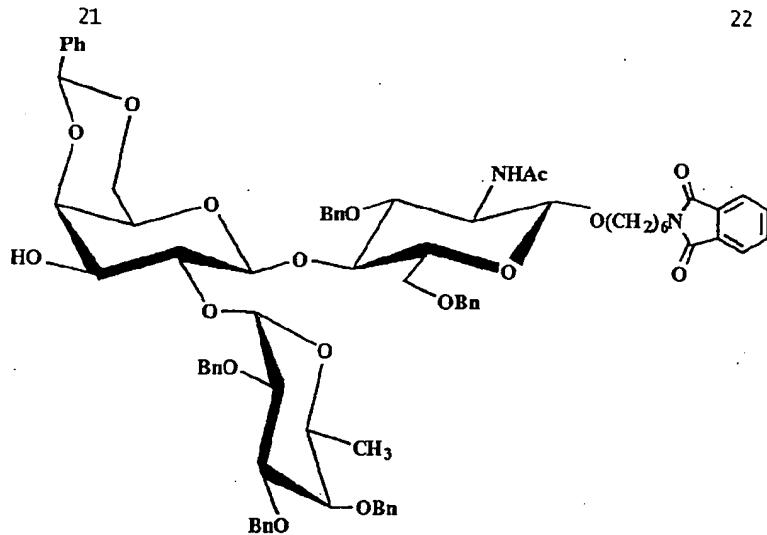
30

※



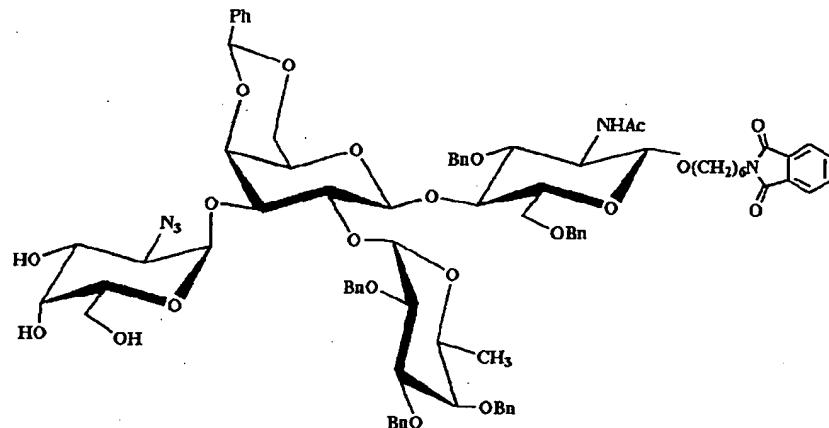
[0079]

[化20]



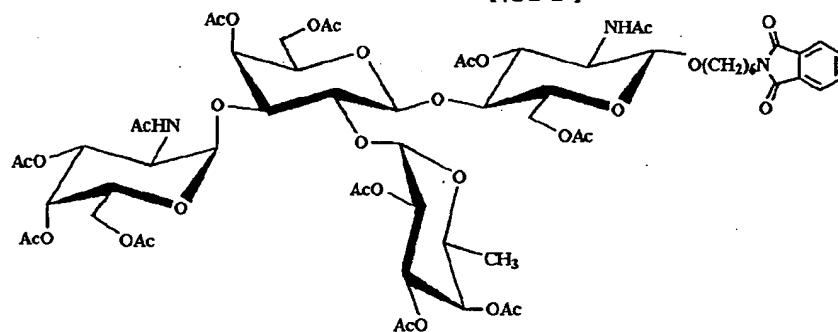
【0080】

\* \* 【化21】



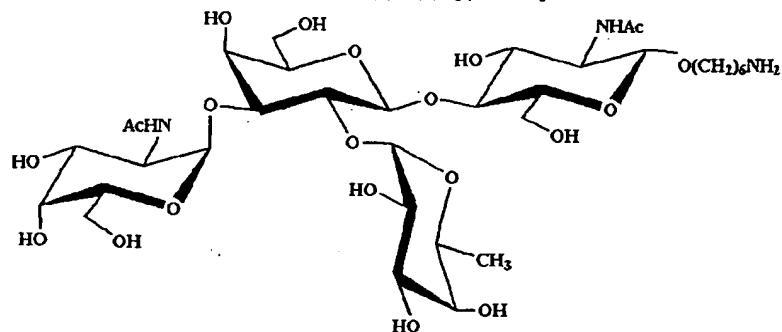
【0081】

※ ※ 【化22】

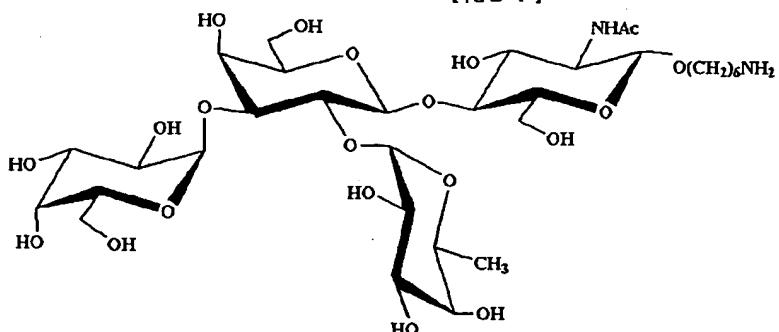


【0082】

★40★【化23】



【0083】

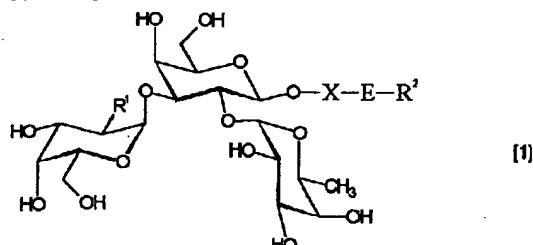


【0084】(但し、Acはアセチル基、Phはフェニル基、Bnはベンジル基、Bzはベンゾイル基を示す。)等が挙げられる。

【0085】本発明の糖鎖化合物がヒト血液型抗原と同じ抗原部位を含んで成る場合の本発明の糖鎖化合物は、例えば一般式【1】

【0086】

【化25】



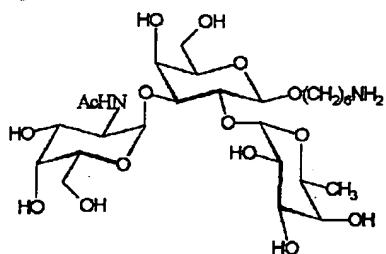
【0087】(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、X及びEは前記と同じ。)で示すことができる。

【0088】一般式【1】に於いて、Xで示される糖残基は、同一でも異なっていてもよい通常1個以上、好ましくは1~5個、更に好ましくは1~3の、本発明の糖鎖化合物を構成する先に説明した単糖残基が、夫々O-グリコシド結合によって結合して形成されたものである。

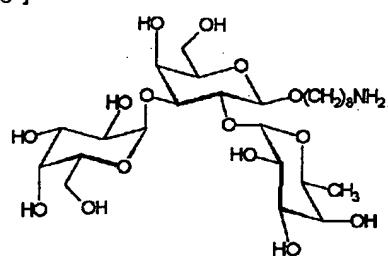
【0089】上記一般式【1】で示される化合物の具体例としては、例えば

【0090】

【化26】

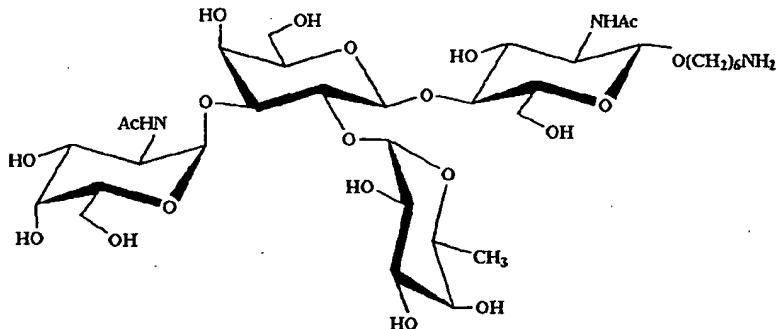


30 【0093】  
【化29】



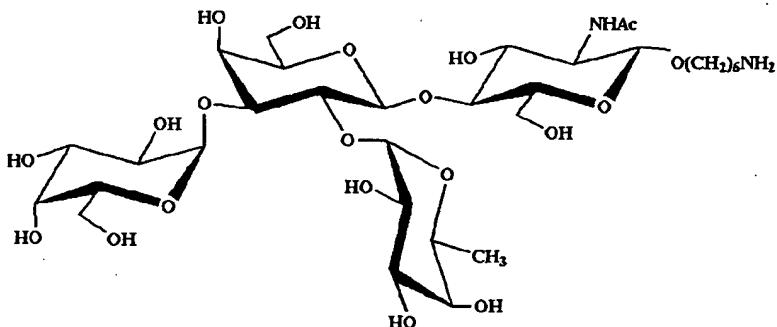
40 【0094】  
【化30】





【0095】

\* \* 【化31】



【0096】(式中、A cはアセチル基を表す。)等が挙げられる。

【0097】本発明の、置換基を有していてもよいアミノ基が、二価の炭化水素残基を介して結合した糖鎖化合物は、例えば一般式〔3〕

【0098】

【化32】



【0099】(式中、E及びR<sup>2</sup>は前記と同じ。)で示される化合物と、2個以上8個以下の先に説明した单糖残基から成り、且つ任意の位置に水酸基(-OR'(R'は前記と同じ。))となっていてもよい。)を有する糖鎖化合物とO-グリコシル化反応させることによって容易に得られる。

【0100】また、本発明の糖鎖化合物は、一般式〔3〕で示される化合物と、1個以上8個未満の先に説明した单糖残基から成り且つ任意の位置に水酸基を有する糖鎖化合物とをO-グリコシル化反応させた後、得られた糖鎖化合物に更に適当な单糖を1個ずつ任意の数までO-グリコシド結合で結合させていくことによっても得られる。

【0101】R<sup>2</sup>が、例えばアルキル基、ハロアルキル基、アリール基、縮合多環式炭化水素の脂肪族環から水素原子を1個除いてできる1価基、アリールアルキル基、アシル基、ハロゲン化アシル基、アルコキシカルボニル基、ハロゲン化アルコキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基、アリールアルキルオキシカルボニル基、縮合多環式炭化水素の脂肪族環から水素原子を1

個除いてできる1価基を置換基として有するアルキルオキシカルボニル基、アシルオキシ基、例えばアルキレン基、ハロゲン化アルキレン基、アリーレン基、ジアシル基、ハロゲン化ジアシル基、アルキレンジオキシカルボニル基、アリーレンジオキシカルボニル基、ジアシルオキシ基等アミノ基の2つの水素原子を同時に置換し得る二価の基等の置換基を有するアミノ基の場合、これを例えれば常法により処理すれば、R<sup>2</sup>がアミノ基である対応する化合物が容易に得られる。また、本発明の化合物のうち、水酸基が-OR'又は-O-R"-O-となっているものについては、常法により処理することにより、-OR'又は-O-R"-O-が-OHとなつて、対応する糖鎖化合物が容易に得られる。

【0102】上記O-グリコシル化反応は、常法に従って行えばよい。即ち、糖残基と一般式〔3〕で示される化合物の水酸基とをO-グリコシド結合させるには、例えば以下の如く行えばよい。

【0103】即ち、1-クロロ置換体、1-ブロモ置換体等のハロゲン化糖化合物等の置換基の離脱により糖化合物となる所謂糖供与体と、1~5当量の、フタルイミド基、トリフルオロアセチル基等、適当な保護基で保護されたアミノ基を有する一般式〔3〕で示される化合物とを、ジクロロメタン、ニトロメタン、アセトニトリル等に溶解し、1~5当量の、例えば過塩素酸銀と炭酸銀、トリフルオロメタンスルホン酸銀とs-コリジン又は臭化水銀とシアノ化水銀等の活性化剤を添加し、好ましくはモレキュラーシーブス4Aやドライアライト等の脱水剤の共存下、-30°C~室温で、2~24時間攪拌下反応させ、次いでシリカゲルカラム等により精製することで、目的とする

化合物を得ることができる。

【0104】また、糖供与体として上記に替え1-チオメチル置換体、1-チオエチル置換体、1-チオフェニル置換体等の1-チオアルキル化糖を用いる場合、当該糖供与体と、1~5当量の、フタルイミド基、トリフルオロアセチル基等、適当な保護基で保護されたアミノ基を有する一般式〔3〕で示される化合物とを、ジクロロメタン、二トロメタン、アセトニトリル等に溶解し、1~5当量の、例えばメチルトリフラート、臭化銅と臭化テラブチルアンミニウム又はN-よう化こはく酸イミドとトリフルオロメタンスルホン酸等の活性化剤を添加し、好ましくはモレキュラーシーブス4Aやドライアライト等の脱水剤の共存下、-30°C~室温で、2~24時間攪拌下反応させ、次いで、シリカゲルカラム等により精製することで、目的とする化合物を得ることができる。

【0105】また、適当な糖鎖と、還元末端に一般式〔3〕で示される化合物をO-グリコシド結合させて得られた糖鎖とをグリコシド結合させるには、例えば以下のように行えばよい。

【0106】即ち、糖供与体として、1-クロロ置換体、1-ブロモ置換体等のハロゲン化糖を用いる場合、糖供与体と、1~5当量の、O-グリコシド結合を形成させたい水酸基以外の水酸基を、アセチル基、ベンゾイル基、ベンジル基等の糖の合成で通常使用される保護基で保護し、且つ、2価の炭化水素残基を介して結合したアミノ基をフタルイミド基、トリフルオロアセチル基等、適当な保護基で保護した糖鎖化合物とを、ジクロロメタン、二トロメタン、アセトニトリル等に溶解し、1~5当量の、例えば過塩素酸銀と炭酸銀、トリフルオロメタンスルホン酸銀とs-コリジン又は臭化水銀とシアノ化水銀等の活性化剤を添加し、好ましくはモレキュラーシーブス4Aやドライアライト等の脱水剤の共存下、-30°C~室温で、2~24時間攪拌下反応させ、次いで、シリカゲルカラム等により精製することで、目的とする化合物を得ることができる。

【0107】または、糖供与体として1-チオメチル置換体、1-チオエチル置換体、1-チオフェニル置換体等の1-チオアルキル化糖を用いる場合、糖供与体と、1~5当量の、O-グリコシド結合を形成させたい水酸基以外の水酸基を、アセチル基、ベンゾイル基、ベンジル基等の糖の合成で通常使用される保護基で保護し、且つ、2価の炭化水素残基を介して結合したアミノ基をフタルイミド基、トリフルオロアセチル基等、適当な保護基で保護した糖鎖化合物とを、ジクロロメタン、二トロメタン、アセトニトリル等に溶解し、1~5当量の、例えばメチルトリフラート、臭化銅と臭化テラブチルアンミニウム又はN-よう化こはく酸イミドとトリフルオロメタンスルホン酸等の活性化剤を添加し、好ましくはモレキュラーシーブス4Aやドライアライト等の脱水剤の共存下、-30°C~室温で、2~24時間攪拌下反応させ、次いで、シリカ

ゲルカラム等により精製することで、目的とする化合物を得ることができる。

【0108】本発明の糖鎖化合物を製造する際に使用する単糖としては、本発明の糖鎖化合物を構成する単糖基の基となる単糖と同じものが挙げられ、また、糖の主鎖に直接結合する水素原子が、必要に応じて、例えば-N<sub>3</sub>等で置換されていてもよい。

【0109】単糖が有していてもよい水酸基は、その一部又は全部が-OR'（R'は前記と同じ。）や、例えば-OC(=O)NHCC<sub>1</sub>、2-(トリメチルシリル)エトキシ基等となっていてもよい。

【0110】本発明の、二価の炭化水素残基を介して、置換基を有していてもよいアミノ基が結合した糖鎖化合物は、置換基を有していてもよいアミノ基を有することで、例えばカルボキシル基、アルコキシカルボニル基、アルキルオキシカルボニル基、ハロホルミル基等のカルボン酸誘導体に由来する基、クロロスルホニル基、ハロゲン化アルキル基、シアネット基、イソシアネット基、エポキシ基、ケトン基、アルデヒド基等を有する担体や色素等と容易に結合し得る。

【0111】本発明の糖鎖化合物が抗原性を有する場合には、本発明の糖鎖化合物は、これを例えればリボソーム、細胞、ペプチド、脂肪酸等の適当なキャリアーに組み込むことにより、免疫源として使用できるため、その抗体を製造することにも利用できる。

【0112】また、本発明の糖鎖化合物のうち、アミノ基に脂肪酸が導入されたものは、リボソーム製造用原料として有用なものであり、これを原料の一つとして用いれば、膜表面に本発明の糖鎖化合物が固定化されたリボソームを容易に得ることができる。

【0113】また、本発明の糖鎖化合物は、それが抗原部位を有する場合には、これを抗原として用いる、例えれば免疫比濁法（臨床検査法概要改訂第30版 金原出版（株）金井泉原著p853参照）、放射免疫測定法（臨床検査法概要改訂第30版 金原出版（株） 金井泉原著p856参照）、酵素免疫法（臨床検査法概要改訂第30版 金原出版（株） 金井泉原著p862参照）、感作粒子凝集法、イムノクロマト法、蛍光偏光法（臨床検査法概要改訂第30版 金原出版（株） 金井泉原著p865参照）等により、該糖鎖化合物に対する抗体の存在を確認すること等にも利用できる。

【0114】即ち、本発明の糖鎖化合物が、例えればヒトA型抗原或いはヒトB型抗原と同じ構造を有している場合には、上記した如き各種方法を利用して血液型の判定を行うこともできる。

【0115】本発明の糖鎖化合物を血液型抗原として用いて、例えれば感作粒子凝集法、イムノクロマト法等を利用して血液型を判定する場合には、例えれば以下のようにすればよい。

【0116】<感作粒子凝集法> A型抗原と同じ抗原部

位を有する本発明の糖鎖化合物を担持させた担体と、例えば血清、血漿等の生体由来試料とを接触させると、該生体由来試料が抗A抗体を有している場合、即ち、血液型B型及びO型の場合は、凝集が起り、目視でこれが確認できるが、生体由来試料が抗A抗体を有していない場合、即ち血液型A型及びAB型の場合には、凝集は起こらない。

【0117】これとは逆にB型抗原と同じ抗原部位を有する本発明の糖鎖化合物を担持させた担体に生体由来試料を添加すると、該生体由来試料が抗B抗体を有していない場合は、凝集は起らぬ、抗B抗体を有している場合には凝集が起こる。

\* 【0118】また、上記凝集反応を利用すれば血液型A B型及びO型も容易に判定し得る。即ち、A型抗原と同じ抗原部位を有する本発明の糖鎖化合物を担持させた担体、及びB型抗原と同じ抗原部位を有する本発明の糖鎖化合物を担持させた担体の夫々に生体由来試料を添加し、これら両方共が凝集する場合、該生体由来試料はO型であることが判り、両方とも凝集が認められない場合は、該生体由来試料はAB型であることが判る。

【0119】所定のヒト血液型に於ける、赤血球上の抗原と血清中の抗体の組み合わせを表1に示す。

【0120】

\* 【表1】

ヒト血液型	赤血球上の抗原	血清中の抗体
A型	A型	抗B
B型	B型	抗A
AB型	A型、B型	無し
O型	H型	抗A、抗B

【0121】<イムノクロマト法>標識物質と結合した、A型（B型）抗原と同じ抗原部位を有する本発明の糖鎖化合物（以下、標識合成血液型抗原と略記する。）を、毛管現象により移動可能なように吸収性担体に保持させ、且つこれとは別の箇所にA型（B型）抗原と同じ抗原部位を有する本発明の糖鎖化合物（以下、合成血液型抗原と略記する。）が担持された吸収性担体の、該標識合成血液型抗原の保持部分に生体由来試料を供し、その結果生じる当該合成血液型抗原の担持部分に於ける、標識物質由來の発色をもとに該生体由来試料の血液型を判定する。

【0122】上記感作粒子凝集法及びイムノクロマト法に於いて用いられる生体由来試料としては、抗A抗体及び／又は抗B抗体を有するものであれば如何なるものでもよい。

【0123】感作粒子凝集法に於いて、糖鎖化合物を担持させる担体としては、アミノ基と反応する官能基を有するものであれば如何なるものでもよく、通常の免疫測定法で用いられる担体である、例えばポリスチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセテート、ポリエステル、ポリアクリル酸、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリエチレン、ポリクロロカーボネート、シリコーン樹脂、シリコーンラバー等の合成高分子化合物、例えば多孔性ガラス、シリガラス、アルミナ、シリカゲル、活性炭、金属酸化物等の無機物質等にアミノ基と反応する、例えば、カルボキシル基、カルボニル基等の官能基が導入されているものが挙げられ、これら担体は、微粒子、ラテックス粒子等の粒子状で使用される。これらの中でも、合成高分子化合物由來のラテックス粒子は、目的に応じて担体表面を化学的処理し易いこと、また非特異反応が起こりにく

20 いこと等の点から好ましく用いられる。

【0124】また、リボソーム、例えばアルブミン、免疫グロブリン等の蛋白質、例えばペルオキシダーゼ(POD)等の糖蛋白質、赤血球等もこの様な目的の担体として好ましいものの一つである。尚、バイオハザードの問題等を考慮すると、赤血球よりも、その他の担体の方が好ましい。

【0125】本発明に使用されるリボソームは、内部に色素を内包し、その膜上に本発明の糖鎖化合物が固定化されたリボソームであればよく、その膜構成成分や調製方法は通常この分野で調製されるリボソームに準じれば足りる。

【0126】即ち、例えばその調製方法としては、従来から知られているボルテックスティング法、超音波法、界面活性剤除去法、逆相蒸発法（REV法）、エタノール注入法、エーテル注入法、プレベジクル(Pre-Vesicle)法、フレンチプレスエクストルージョン(French Press Extrusion)法、Ca<sup>2+</sup>融合法、アニーリング(Annealing)法、凍結融解融合法、凍結乾燥法、W/O/Wエマルジョン法等の方法や、S.M.Grunerら [Biochemistry, 24, 28

40 33(1985)]により報告されたStable Plurilamellar Vesicle法（SPLV法）等の方法が全て挙げられ、これらの方法により作製されたリボソームを、フレンチプレス、加圧ろ過器或はエクストルーダーを用いて一定の大きさの細孔径を有する膜等を通してにより、目的の性質を有するリボソームを得ることが出来る。

【0127】また、その主たる膜構成成分としては、通常のリボソームの調製に於いて膜構成成分として用いられている天然レシチン（例えば、卵黄レシチン、大豆レシチン等）やジパルミトイロフオスファチジルコリン(DPPC)、ジミリストイルfosファチジルコリン(DMPC)、

31

ジステアロイルフォスファチジルコリン(DSPC), ジオレオイルフォスファチジルコリン(DOPC), ジバルミトイールホスファチジルエタノールアミン(DPPE), ジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン(DMPE), ジバルミトイールフォスファチジルグリセロール(DPPG), ジミリストイルフォスファチジルグリセロール(DMPG), ジミリストイルフォスファチジン酸(DMPA), 卵黄フォスファチルグリセロール等のリン脂質、或はガングリオシド糖脂質、スフィンゴ糖脂質、グリセロ糖脂質等の糖脂質等の1種又は2種以上、或はこれらとコレステロール類との混合系等を組み合わせたもの等が全て挙げられる。尚、例えばKinsky,S.C(Biochemistry,8,4149,1969)らの用いたリン脂質を含むヒツジ赤血球クロロホルム抽出分画等をその構成成分として含むリポソーム等も使用できることはいうまでもない。

【0128】本発明に関わるリポソームに内包させる色素としては、J.Liposome Res.(D.Monroe:1(3),339-377,1989-90)に示されるように、例えばカルボキシフルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、フルオレセインイソシアネート、テトラローダミンイソチオシアネート、5-ジメチルアミノ-1-ナフタレンスルフォニルクロリド等の蛍光物質類、例えばアルセナゾIII、4-(2-ビリジルアゾ)レゾルシノール、2-(5-プロモ-2-ビリジルアゾ)-5-(N-プロビル-N-スルホプロビルアミノ)フェノール ナトリウム塩等の色素類、例えばルミノール、イソルミノール、ルシフェリン、エオシンY、オーラミンO、ビス(2,4,6-トリクロロフェニル)オキザレート、N-メチルアクリジニウムエステル等の発光物質類等のリポソーム自体を目視で確認可能と/orするものであれば何でもよく、これらの中から検出方法、感度及びリポソームの安定性を考慮して適宜選択すればよい。

【0129】本発明で用いられるリポソームへの本発明の糖鎖化合物の固定化方法としては、通常この分野で用いられるリポソームへのハブテン等の固定化方法に準じて行えばよく、例えば本発明の糖鎖化合物の脂肪酸誘導体やリン脂質誘導体等をリポソーム膜構成成分として用いる方法(Kinsky,S.C,Biochemistry,8,4149,1969,S.Shichijo,Journal of Immunological Methods,85,53-63,1985,K.Uemura,Biochemistry,vol.11, No.22,4085,1972,T.masaki,Journal of Immunological Methods,123,19-24,1989,C.Braman,Bio.Technology,April,349,1984,U.Glagasigijj,Chem.Pharm.Bull.,36,1086,1988,K.Kubotsu,Clin.Chem,38,808,1992等)が好ましく挙げられる。また、「統生化学実験講座5 免疫生化学実験法、第1版第1刷、編集:(社)日本生化学会、(株)東京化学同人、144~148頁、1986年3月14日発行」等に記載の架橋法によりリポソーム膜表面に本発明の糖鎖化合物を固定化する方法等を利用して本発明に係わるリポソームを調製することも可能である。

32

【0130】尚、該架橋法に於いて用いられる架橋剤としては、例えばN-スクシンイミジル3-(2-ビリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、N-スクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート(SMPB)、N-スクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)アセテート(SMPA)、N-スクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)プロピオネートアセテート(SMPP)、N-(4-マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミド(GMBS)およびN-(6-マレイミドカブロイルオキシ)スクシンイミド(EMCS)等が挙げられる。

【0131】感作粒子凝集法に於いて、担体に本発明の糖鎖化合物を担持させるには、本発明の糖鎖化合物が持つ置換基を有していてもよいアミノ基と、担体の持つアミノ基と反応する官能基とを常法により化学結合させればよい。

【0132】感作粒子凝集法に於いて、本発明の糖鎖化合物の担体への担持量は、担体の単位表面積(cm<sup>2</sup>)当たりの担持量として0.1pg~1ng、好ましくは0.5~200pg更に好ましくは1~200pgである。

【0133】イムノクロマト法に於いて、糖鎖化合物を担持させる吸収性担体としては、通常の免疫学的測定法で用いられる担体のうち、吸収性を有し、毛細管現象が生じる性質を有するものであればよく、例えば多孔性を有するシート状乃至膜状物、発泡体、織布状物、不織布状物、編物状物等が挙げられ、これらは天然、半合成又は全合成の繊維状或いはその他の形状の素材を、例えば抄紙、製膜、発泡成型、編製等の常法により成型することにより得られるもの等が含まれ、それらの素材としては、例えば綿、麻、絹、セルロース、ニトロセルロース、セルロースアセテート、ロックウール、獣毛、カーボン繊維、ボロン繊維等の繊維物質、例えばポリスチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリビニルアルコール、ポリビニルアセテート、ポリエステル、ポリアクリル酸、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリエチレン等の合成高分子化合物等が挙げられる。

【0134】イムノクロマト法に於いて、吸収性担体に本発明の糖鎖化合物を担持させる方法としては、例えば吸収性担体に合成血液型抗原を含有する溶液を、例えば塗布、滴下、或いは噴霧等した後、これを乾燥して物理的吸着により担持させる方法や、吸収性担体がアミノ基と反応する官能基を有している場合には、感作粒子凝集法の担持方法と同様、化学結合によって本発明の糖鎖化合物を吸収性担体に担持させる方法等が挙げられる。このように本発明の糖鎖化合物が担持された吸収性担体は、非特異的な吸着による測定への影響を防止するために、所謂ブロッキング処理を施して於くことが望ましい。ブロッキング処理は、通常この分野で行われる方法、例えば合成抗原が担持された吸収性担体を例えばアルブミン、グロブリン、カゼイン、ポリビニルアルコール、界面活性剤等のブロッキング剤(但し、測定への影響がないものを選択して使用する。)を含有する適当な

緩衝液（例えばpHが5～9程度で、10～500mMの例えばトリス緩衝液、リン酸緩衝液、ペロナール緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液等）中に適当な時間浸漬した後に乾燥する方法等により行えばよい。

【0135】合成血液型抗原の吸収性担体への担持量は、判定する血液型の種類や、検出限界等により変動するが、吸収性担体の合成血液型抗原が担持される部分の単位面積(cm<sup>2</sup>)当たりの担持量として、通常0.01μg～1mg、好ましくは0.05μg～100μg、より好ましくは0.1μg～50μgである。

【0136】標識物質としては、これを合成血液型抗原に標識したものが所謂毛管現象により移動可能なものとなるようなものであればよく、例えばラジオアイソトープ、例えば酵素、例えば金コロイド、鉄コロイド、銀コロイド等の金属コロイド、例えばセレンニウムコロイド等の非金属コロイド、例えばローダミンB、ローダミンイソチオシアネット、カルボキシルフルオレッセン、フルオレッセンイソチオシアネット等の蛍光色素、例えばクーマシーブリリアントブルーR250、メチルオレンジ等の色素、例えばポリスチレン、ポリアクリルアミド等の高分子ポリマーを原料として調整された着色ラテックス、例えば上記の如き蛍光色素や色素等を内包する着色リボソーム等が挙げられる。中でも、例えば金コロイド、セレンニウムコロイド、着色ラテックス等の視覚的に検知し得るシグナルが得られる標識物質が好ましく、特に取り扱い易さや感度の点からみると金コロイドが好ましい。

【0137】標識合成血液型抗原の吸収性担体への保持量は、判定する血液型の種類や、検出限界等により変動するが、吸収性担体の標識合成血液型抗原が保持される部分の単位面積(cm<sup>2</sup>)当たりの保持量として、標識合成血液型抗原の未標識血液型抗原量に換算して、通常0.01μg～10mg、好ましくは0.05μg～1mg、より好ましくは、0.1～100μgである。

【0138】尚、本発明の糖鎖化合物を上記した如き担体に固定化して用いる場合、担体に導入する際に立体障害を起こしたりせず、固定化後にその抗原性を維持し得るようにするために、スペーサーとして用いられる炭化水素残基はある程度の長さを有している方が望ましい。例えば、アルキレン基をスペーサーとして用いるのであれば、炭素数2～10、好ましくは3～8のもの、中でも直鎖状のものが好ましく挙げられる。

【0139】尚、本発明の糖鎖化合物を担体に担持させて、ヒト血液型の判定に用いる場合、一般式〔1〕で示される化合物の中でも、Xで示される糖残基が1～5個の单糖残基から成るものは、Xが結合手であるものよりも、抗体との反応性が強いので、ヒト血液型判定試薬用原料としては、より好ましい。

【0140】本発明のヒト血液型判定用試薬は、本発明の糖鎖化合物をその主要成分として含有するものであり、通常本発明の糖鎖化合物を上述した如き方法により

上述した如き担体に固定化（感作）した形態を取る。また、その好ましい様、使用濃度等は上記に記載した通りである。

【0141】また、本発明のヒト血液型判定用試薬が感作粒子凝集法用試薬の場合、本発明の糖鎖化合物を感作（固定化）させた、ラテックス粒子、リボソーム、蛋白質、赤血球等は、通常適当な緩衝液中に懸濁又は溶解させた溶液状態で提供される。このような目的で用いられる緩衝液としては、通常この分野で用いられるものは全て使用可能であり、その緩衝剤濃度やpH等は、通常この分野で使用される範囲の中から適宜選択すればよい。また、当該緩衝液中には、この分野で通常用いられる、防腐剤、界面活性剤、例えばポリエチレングリコール等の凝集促進剤、例えばマグネシウムイオン等の非特異反応防止剤等が含まれていてもよく、その使用濃度も通常この分野で使用される範囲で適宜選択すればよい。

【0142】上記の如く、本発明の糖鎖化合物は、置換基を有していてもよいアミノ基が、二価の炭化水素残基を介して結合しているため、従来直接結合させることができなかったカルボキシル基、アルコキシカルボニル基、アシリオキシカルボニル基、ハロホルミル基、クロロスルホニル基、シアネット基、エポキシ基、ケトン基、アルデヒド基等を有する担体等と容易に結合させることができるというだけでなく、従来では標識化が困難であったカルボキシル基含有糖鎖化合物の担体、色素等への標識化を容易に行うことが可能となる。

【0143】更に、適当な長さのスペーサーを有するものを用いれば、従来の方法で生じていた、例えば立体障害により担体への導入が妨げられたり、リボソームを担体として用いた場合に、導入後に抗原活性を維持できない等の問題を回避することができる。

【0144】更にまた、本発明の糖鎖化合物がヒト血液型抗原と同じ抗原部位含んで成る場合には、それを用いることにより、対応する抗体の製造ができ、また、本発明の糖鎖化合物を利用して該糖鎖化合物自体或いはその抗体の存在を確認すること、即ち本発明の糖鎖化合物を用いて製造したヒト血液型判定用試薬を用いることにより、容易にヒト血液型の判定ができる。

【0145】以下に、参考例及び実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらにより何等限定されるものではない。

#### 【0146】

##### 【実施例】

##### <糖鎖化合物の合成>

##### 実施例1.

(1) 3-アミノ-1-プロパノール 1.04gをクロロホルム 3mlに溶解し、トリフルオロ酢酸メチル 2.0gのクロロホルム(1ml)溶液を添加した。室温で2時間攪拌した後、反応液を精製し、減圧濃縮して CF<sub>3</sub>CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH 2.35gを得た（収率：99.2%）。

35

元素分析 C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub>F<sub>3</sub> (171.12)として

計算値(%) : C:35.10, H:4.71, N:8.19

実測値(%) : C:34.93, H:4.89, N:8.20

【0147】(2) 6-アミノ-1-ヘキサンオール 10gをクロロホルム 5mlに溶解し、トリフルオロ酢酸メチル 1.1gのクロロホルム(1ml)溶液を添加した。室温で5時間攪拌した後、反応液を精製し、ジエチルエーテル/ヘキサンで結晶化させ、CF<sub>3</sub>CONH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>OH 1.62gを得た(収率: 89.0%)。

融点: 39.1~40.7°C

元素分析 C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub>F<sub>3</sub> (213.20)として

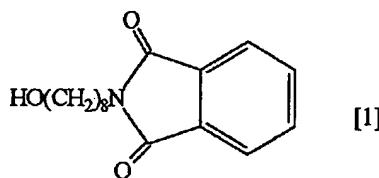
計算値(%) : C:45.07, H:6.62, N:6.57

実測値(%) : C:44.98, H:6.61, N:6.55

【0148】(3) 8-ブロモ-1-オクタノール 1.13g及びタルイミドカリウム 1.0gをDMFに溶解し、100°Cで2時間攪拌した。反応液をクロロホルム 250mlで希釈し、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去した後、ヘキサンで結晶化させ、化合物[1]

【0149】

【化33】



【0150】1.39gを得た(収率: 93.3%)。

融点: 56.7~57.4°C

元素分析 C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub> (275.35)として

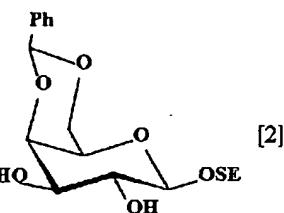
計算値(%) : C:69.79, H:7.69, N:5.09

実測値(%) : C:69.80, H:7.68, N:5.11

【0151】(4) ベンタアセチル-β-D-ガラクトースより、文献 [J. Org. Chem., 53, 5629 (1988)] に記載の方法に準じて合成した2-(トリメチルシリル)エチル 2,3,4,6-テトラ-O-アセチルガラクトビラノシド 97.8gを、メタノール 1.3Lに溶解し、28%ナトリウムメチラート 3.3mlを添加した。室温で終夜攪拌した後、陽イオン交換樹脂アンバーリスト15を加えて中和した。これを濾別した後、濾液を濃縮し、残渣をベンゾアルデヒド 200ml、辛酸 200mlに溶解した。室温で1時間攪拌した後、飽和重曹水で中和し、酢酸エチルで抽出した。有機層を食塩水で2回洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去し、残渣を精製した後、結晶化を行い、化合物[2]

【0152】

【化34】



【0153】(式中、Phはフェニル基、SEは2-(トリメチルシリル)エチル基を表す。) 45.0gを得た(収率: 56.5%)。

10 融点: 108.5~109.7°C

元素分析 C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>Si (368.50)として

計算値(%) : C:58.67, H:7.66,

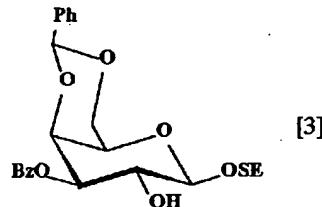
実測値(%) : C:58.64, H:7.68,

【0154】(5)(4)で得られた化合物[2] 45.0gを、ビリジン 207mlに溶解し、0°Cで冷却下ベンゾイルシアニド 48g のアセトニトリル(23ml)溶液を添加した。0°Cで3時間攪拌した後、メタノール 300mlを添加し、更に室温で1時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、ジクロロメタンで抽出した。有機層を0.2N-塩酸、飽和

20 重曹水、食塩水で順次洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去後、残渣をシリカゲルカラム(溶離液: ヘキサン: 酢酸エチル = 3:1)で精製した。ヘキサン/酢酸エチルより結晶化を行い、化合物[3]

【0155】

【化35】



【0156】(式中、Bzはベンゾイル基を表し、Ph及びSEは前記と同じ。) 52.0gを得た(収率: 90.1%)。

融点: 115.3~117.0°C

元素分析 C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>Si (472.61)として

計算値(%) : C:63.54, H:6.82,

実測値(%) : C:63.54, H:6.83,

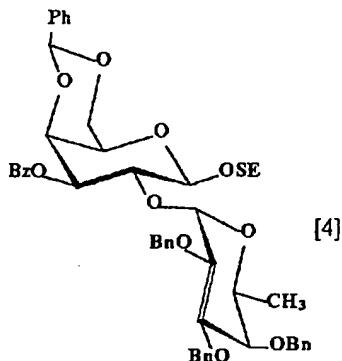
40 【0157】(6)(5)で得られた化合物[3] 52.0gと、フコース(Aldrich社製)より文献 [Carbohydr. Res., 209, C1 (1991), Carbohydr. Res., 201, 31 (1990)] に記載の方法に準じて合成したメチル 2,3,4-トリ-O-ベンジル-1-チオ-β-D-フコシルビラノシド 58.7gとを1,2-ジクロロメタン: DMF = 5:1混合溶媒 2Lに溶解し、それに臭化銅(II) 44.2g、テトラブチルアンモニウムプロミド 70.9g及びモレキュラーシーブス4A 90gの混合物を添加した。窒素雰囲気下、室温で60時間攪拌した後、反応液を濾過し、濾液を減圧濃縮して得られた残渣を酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和重曹水、食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去後、残渣をシリカゲルカラム(溶離液: ヘキサン: 酢酸エチル = 3:1)で精製した。ヘキサン/酢酸エチルより結晶化を行い、化合物[4]

37

チル=6:1)で精製し、化合物[4]

【0158】

【化36】



【0159】(式中、Bnはベンジル基を表し、Ph、SE、Bzは前記と同じ。) 82.4gを得た(収率: 84.2%)。

元素分析 C<sub>52</sub>H<sub>66</sub>O<sub>11</sub>Si(889.13)として

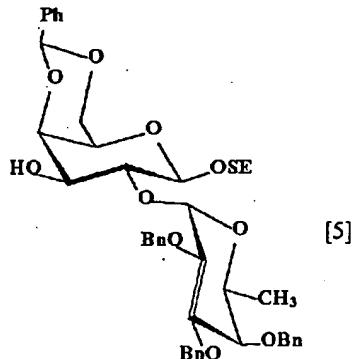
計算値(%)：C:70.25, H:6.80,

実測値(%)：C:70.28, H:6.84,

【0160】(7) (6) で得られた化合物[4] 82.4gを、ベンゼン:メタノール=1:9混合溶媒 5Lに溶解し、1N-ナトリウムメチラート 1Lを添加した。室温で2昼夜攪拌した後、酢酸 60mlを加えて中和し、これを濃縮して得られた残渣を酢酸エチルで抽出した。有機層を食塩水で2回洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去後、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:ヘキサン:酢酸エチル=4:1)で精製した。ヘキサンより結晶化を行い、化合物[5]

【0161】

【化37】



【0162】58.8gを得た(収率: 80.9%)。

融点: 102.7~103.6°C

元素分析 C<sub>45</sub>H<sub>66</sub>O<sub>11</sub>Si(785.02)として

計算値(%)：C:68.85, H:7.19,

実測値(%)：C:68.82, H:7.20,

【0163】(8) (7) で得られた化合物[5] 1.0

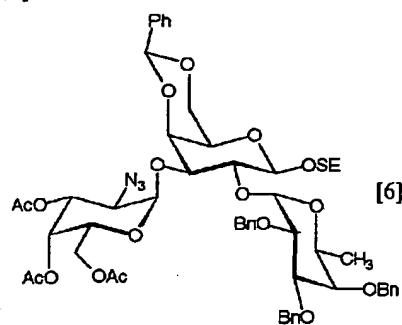
g. 炭酸銀 7.4g及び無水硫酸カルシウム 6.5gとをジ

ロロメタン 40mlに溶解し、-30~-20°Cに冷却した。こ

れにトリフルオロメタンスルホン酸銀 0.36g、次いでペントアセチル-β-D-ガラクトース(Aldrich社製)より文献[Can. J. Chem., 57, 1244 (1979)]に記載の方法に準じて合成した3,4,6-トリ-O-アセチル-2-アジト-2-デオキシ-α-D-ガラクトビラノシリルプロミド 1.51gのジクロロメタン(10ml)溶液を添加した。同温度で3.5時間攪拌した後、反応液を濾過した。濾液を食塩水で2回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去後、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:ヘキサン:酢酸エチル=3:1)で精製し、化合物[6]

【0164】

【化38】



【0165】(式中、Acはアセチル基を表し、Ph、SE及びBnは前記と同じ。) 1.37gを得た(収率: 97.9%)。

元素分析 C<sub>52</sub>H<sub>66</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub>Si(1098.29)として

計算値(%)：C:62.34, H:6.52, N:3.83

実測値(%)：C:62.40, H:6.59, N:3.79

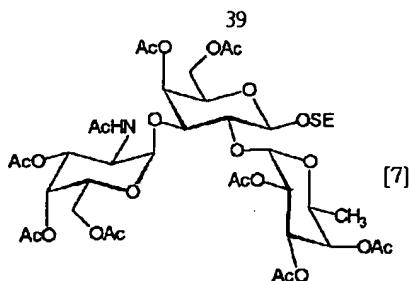
【0166】(9) (8) の方法により得られた化合物

30 [6] 5.0gを酢酸 150mlに溶解し、10%パラシウム炭素 5gを添加した。水素雰囲気下、室温で5日間攪拌した後、反応液を濾過した。濾液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:クロロホルム:メタノール=9:1)で精製した。次いで、得られた化合物をピリジン 70ml、無水酢酸 30mlに溶解し、N,N-ジメチルアミノピリジン 10mgを添加した。室温で終夜攪拌した後、反応液を濃縮し、酢酸エチルで抽出した。有機層を0.2N-塩酸、飽和重曹水、食塩水で順次洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去後、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:クロロホルム:メタノール=50:1)で精製した。ジエチルエーテルより結晶化を行い、化合物

[7]

【0167】

【化39】



【0168】3.47gを得た(收率: 78.9%)。

融点: 112.6~114.5°C

元素分析 C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Si (966.03)として

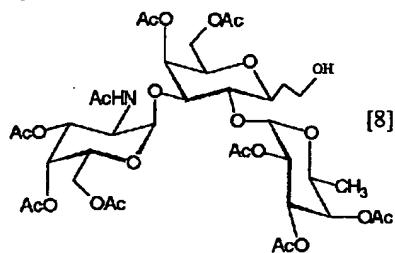
計算値(%) C: 50.98, H: 6.57, N: 1.45,

実測値(%) C: 51.10, H: 6.65, N: 1.41,

【0169】(10)(9)で得られた化合物[7] 3.23gをジクロロメタン 10mlに溶解し、氷冷下三つまつ化ほう素ジエチルエーテル錯体 4.24mlを添加した。氷冷下3.5時間攪拌した後、反応液をジクロロメタンで希釈した。ジクロロメタン層を飽和重曹水、食塩水で順次洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去後、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:ヘキサン:酢酸エチル=1:4)で精製し、化合物[8]

【0170】

【化40】



【0171】(式中、Acは前記と同じ。) 1.79gを得た(收率: 61.9%)。

元素分析 C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (865.79)として

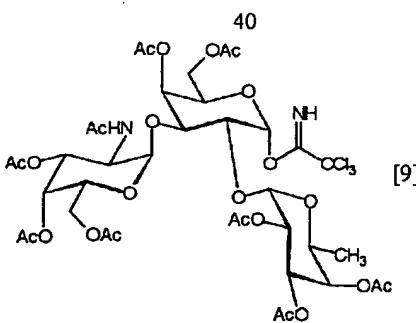
計算値(%) C: 49.79, H: 5.94, N: 1.62,

実測値(%) C: 49.84, H: 5.99, N: 1.59,

【0172】(11)(10)の方法により得られた化合物[8] 1.85gをジクロロメタン10mlに溶解し、氷冷下トリクロロアセトニトリル3ml、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン 370μlを添加した。氷冷下2時間攪拌した後、反応液を濃縮し、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:ヘキサン:酢酸エチル:エタノール=10:5:1)で精製した。ヘキサンで粉末化し、化合物[9]

【0173】

【化41】



10 【0174】(式中、Acは前記と同じ。) 1.55gを得た(收率: 71.8%)。

元素分析 C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>Cl<sub>3</sub> (1010.18)として

計算値(%) C: 45.18, H: 5.09, N: 2.77,

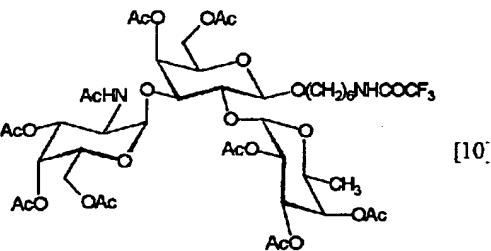
実測値(%) C: 45.11, H: 5.09, N: 2.78,

【0175】(12)(11)の方法により得られた化合物[9] 2.0g、(2)で得られたCF<sub>3</sub>CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>OH 850mg及びモレキュラーシーブス4A 15gをジクロロメタン 60mlに懸濁し、氷冷下でこれにトリメチルシリルトリフルオロメタンスルホン酸 1mlを添加した。反応液

20 を氷冷下で1時間、室温で1.5時間攪拌した後、クロロホルム/メタノール=5/1混液 100mlで希釈した。不溶物を濾去した後、濾液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:ヘキサン:酢酸エチル:エタノール=10:5:1)で精製して化合物[10]

【0176】

【化42】



30 【0177】(式中、Acは前記と同じ。) 2.03gを得た(收率: 96.7%)。尚、<sup>1</sup>H-NMRにより、目的化合物が得られたことを確認した。

元素分析 C<sub>14</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>F<sub>3</sub> (1060.98)として

計算値(%) C: 49.81, H: 5.99, N: 2.64,

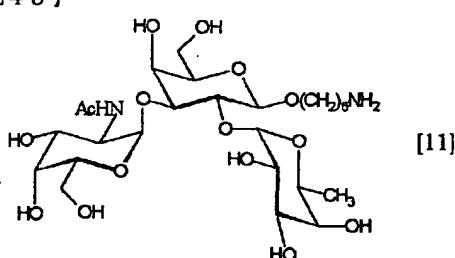
実測値(%) C: 49.87, H: 6.07, N: 2.62,

40 【0178】実施例2.

実施例1で得られた化合物[10] 2.0gをメタノール 160mlに溶解し、それに28%ナトリウムメトキシド 0.6mlを加えた後、室温で一夜攪拌し、更に25%アンモニア水 40mlを加えて室温で2日間攪拌した。反応液を酢酸で中和し、減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:クロロホルム:メタノール:酢酸:水=6:4:0.5:0.5)で精製し、溶出画分を減圧濃縮した。残渣をゲル濃過カラム(溶離液:メタノール)で精製し、化合物[11]

50 【0179】

【化43】



〔0180〕(式中、A cは前記と同じ。) 700mgを得た。(收率: 59.3%)

尚、<sup>1</sup>H-NMRにより、目的化合物が得られたことを確認した。

元素分析 C<sub>26</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub> (628.67)として

計算値(%): C:49.67, H:7.70, N:4.46,

実測値(%): C:49.69, H:7.71, N:4.44,

得られた化合物のIRスペクトルを図1に示す。

#### 〔0181〕実施例3

(1) 実施例1の(7)で得られた化合物 [5] 2.83

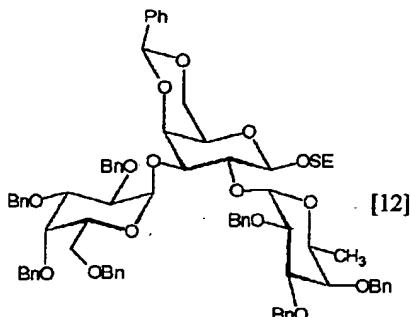
a. ベンタアセチル-β-D-ガラクトース(Aldrich社製)より文献〔Justus Liebigs Ann. Chem., 657, 179 (196

2)〕に記載の方法に準じて合成したエチル 2,3,4,6-テトラ-0-ベンジル-1-チオ-β-ガラクトビラノシド 2.11g

及びモレキュラーシーブス4A 2gのジエチルエーテル溶液にトリフルオロメタンスルホン酸メチル 2.0mlを添加した。窒素雰囲気下、室温で20時間攪拌した後、反応液をトリエチルアミン 5.0mlで中和した。不溶物を濾別し、濾液を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:ヘキサン:酢酸エチル=1:1)で精製した。熱エタノールより再結晶化を行い、化合物 [12]

#### 〔0182〕

#### 【化44】



〔0183〕(式中、Ph、SE及びBnは前記と同じ。) 3.26gを得た(收率: 69.1%)。融点: 112.9~114.1°C

元素分析 C<sub>26</sub>H<sub>48</sub>O<sub>11</sub>Si (1307.66)として

計算値(%): C:72.56, H:6.94,

実測値(%): C:72.55, H:6.96,

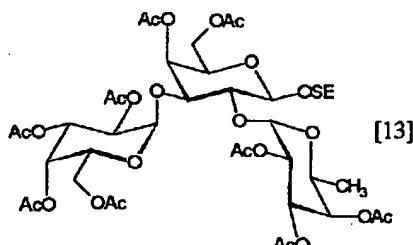
〔0184〕(2)(1)の方法で得られた化合物 [12] 9.54gを酢酸 300mlに溶解し、10%バラジウム炭素9.5gを添加した。水素雰囲気下、室温で3日間攪拌した

42

後、反応液を濾過し、濾液を減圧乾固した。次いで、得られた残渣をビリジン 200ml、無水酢酸 300mlに溶解し、N,N-ジメチルアミノビリジン 30mgを添加した。室温で終夜攪拌した後、反応液を濃縮し、クロロホルムで抽出した。有機層を0.2N塩酸、飽和重曹水、食塩水で順次洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去後、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:ヘキサン:酢酸エチル=1:1)で精製した。ジエチルエーテルより結晶化を行い、化合物 [13]

#### 〔0185〕

#### 【化45】



〔0186〕(式中、SE及びA cは前記と同じ。) 5.

20 62gを得た(收率: 70.9%)。融点: 95.4~98.0°C

元素分析 C<sub>41</sub>H<sub>64</sub>O<sub>24</sub>Si (967.01)として

計算値(%): C:50.92, H:6.46,

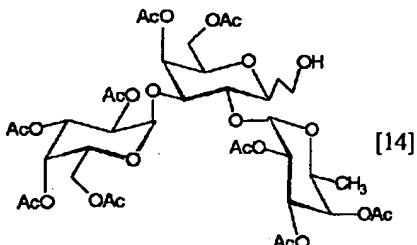
実測値(%): C:50.94, H:6.49,

〔0187〕(3)(2)で得られた化合物 [13]

1.50gをジクロロメタン 5mlに溶解し、氷冷下三つまつ化ほう素ジエチルエーテル錯体 2.0mlを添加した。氷冷下4時間攪拌した後、反応液をジクロロメタンで希釈した。ジクロロメタン層を飽和重曹水、食塩水で順次洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去後、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:ヘキサン:酢酸エチル=1:2)で精製し、化合物 [14]

#### 〔0188〕

#### 【化46】



〔0189〕(式中、A cは前記と同じ。) 1.06gを得た(收率: 79.1%)。

元素分析 C<sub>26</sub>H<sub>48</sub>O<sub>24</sub>Si (866.78)として

計算値(%): C:49.89, H:5.81,

実測値(%): C:49.92, H:5.83,

〔0190〕(4)(3)の方法で得られた化合物 [14]

4 1.12gをジクロロメタン 5mlに溶解し、氷冷下トリクロロアセトニトリル 2ml及び1,8-ジアザビシクロ[5,4,0]-7-ウンデセン 224μlを添加した。氷冷下2時間攪拌した後、反応液を濃縮し、残渣をシリカゲルカラム

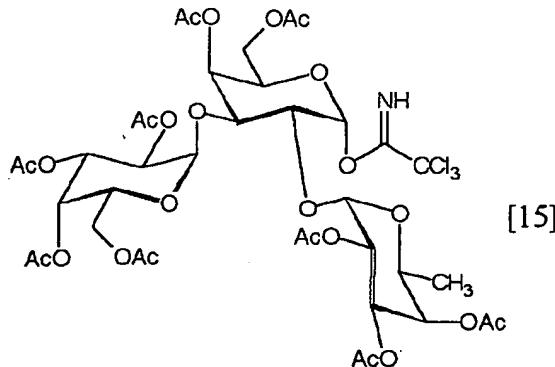
50 留去後、残渣をシリカゲルカラム

(溶離液:ヘキサン:酢酸エチル:クロロホルム=20:10:

1)で精製した。ヘキサンで粉末化し、化合物 [15]

[0191]

[化47]



[15]

[0192] (式中、A cは前記と同じ。) 1.20gを得た。

\*た(収率: 92.0%)。

元素分析 C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>6</sub>Cl<sub>3</sub> (1011.17)として

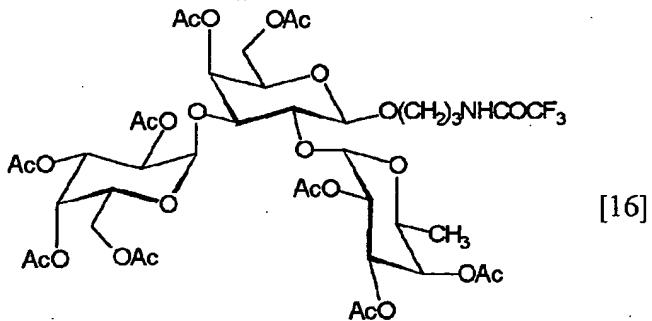
計算値(%): C:45.14, H:4.98, N:1.39,

実測値(%): C:45.09, H:5.00, N:1.41,

[0193] (5) (4) の方法で得られた化合物 [15] 50mg、実施例1の(1)で得られたCF<sub>3</sub>CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH 26mg及びモレキュラーシーブズ4A 370mgをジクロロメタン1.5mlに懸濁し、これにトリメチルシリルトリフルオロメタンスルホン酸 25μlを添加した。反応液を室温で1時間攪拌した後、クロロホルム/メタノール=5/1混液 5mlで希釈した。不溶物を濾去し、反応液を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:ヘキサン:酢酸エチル:エタノール=20:10:1)で精製して化合物 [16]

[0194]

[化48]



[16]

[0195] を定量的に得た。尚、<sup>1</sup>H-NMRにより、目的化合物が得られたことを確認した。

元素分析 C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>6</sub>F<sub>3</sub> (1019.88)として

計算値(%): C:48.29, H:5.53, N:1.37,

実測値(%): C:48.36, H:5.61, N:1.35,

[0196] 実施例4.

実施例3の(4)の方法で得られた化合物 [15] 2.0

g、実施例1の(2)で得られたCF<sub>3</sub>CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH 850mg

及びモレキュラーシーブズ4A 15gをジクロロメタン 6ml

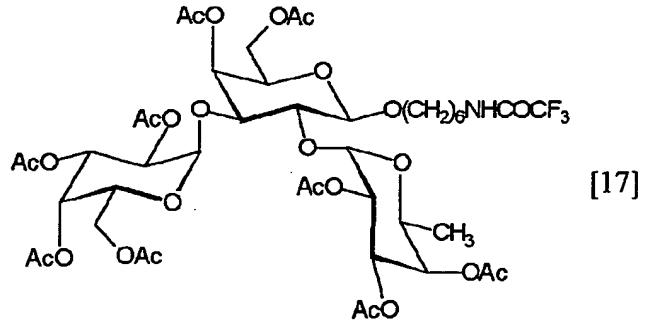
※0mlに懸濁し、これにトリメチルシリルトリフルオロメタンスルホン酸 1mlを添加した。反応液を氷冷下で1時間、室温で1.5時間攪拌した後、クロロホルム/メタ

ノール=5/1混液 100mlで希釈した。不溶物を濾去し、濾液を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:ヘキサン:酢酸エチル:エタノール=10:5:

1) 精製して化合物 [17]

[0197]

[化49]



[17]

[0198] 1.83gを得た。(収率: 87.0%)

尚、<sup>1</sup>H-NMRにより、目的化合物が得られたことを確認した。

元素分析 C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>6</sub>F<sub>3</sub> (1061.96)として

計算値(%): C:49.76, H:5.88, N:1.32,

実測値(%): C:49.80, H:5.91, N:1.31,

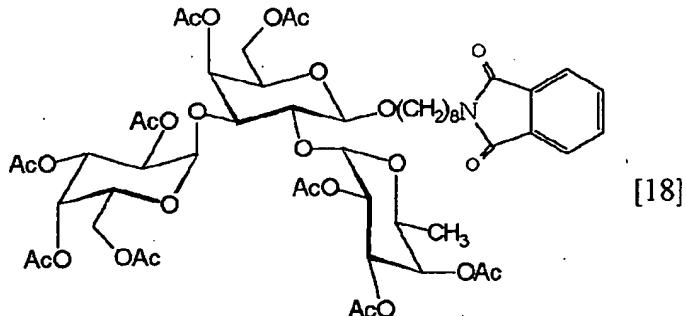
[0199] 実施例5. 実施例3の(4)の方法で得られた化合物 [15] 50mg、実施例1の(3)で得られた化合物 [1] 28mg及びモレキュラーシーブズ4A 37

0mgをジクロロメタン 1.5mlに懸濁し、これにトリメチ

45

ルシリルトリフルオロメタンスルホン酸 $25\mu\text{l}$ を添加した。反応液を室温で1時間攪拌した後、クロロホルム/メタノール=5/1混液 $5\text{ml}$ で希釈した。不溶物を濾去し、濾液を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラム\*して、  
\* (溶離液:ヘキサン:酢酸エチル:エタノール=20:10:1)で精製して化合物[18]

【0200】  
【化50】



【0201】を定量的に得た。

尚、 $^1\text{H-NMR}$ により、目的化合物が得られたことを確認した。

元素分析  $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{NO}_6$  (1124.11)として

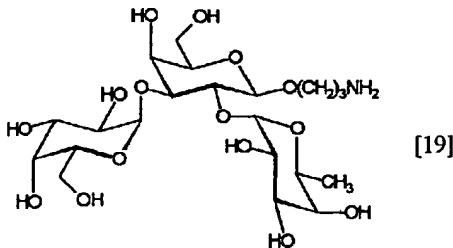
計算値(%) : C:55.56, H:6.19, N:1.25,

実測値(%) : C:55.59, H:6.22, N:1.21,

【0202】実施例6. 実施例3で得られた化合物[16]  $51.0\text{mg}$ をメタノール $4\text{ml}$ に溶解し、それに28%ナトリウムメトキシド $30\mu\text{l}$ を加えた後、室温で一夜攪拌し、更に25%アンモニア水 $3\text{ml}$ を加えて室温で3時間攪拌した。反応液を酢酸で中和し、減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:クロロホルム:メタノール:酢酸:水=6:4:0.5:0.5)で精製し、溶出画分を減圧濃縮した。残渣をゲル濃過カラム(溶離液:メタノール)で精製して化合物[19]

【0203】

【化51】



【0204】 $21\text{mg}$ を得た(収率: 78.7%)。

尚、 $^1\text{H-NMR}$ により、目的化合物が得られたことを確認した。

元素分析  $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{NO}_6$  (545.54)として

計算値(%) : C:46.24, H:7.21, N:2.57,

実測値(%) : C:46.25, H:7.23, N:2.57,

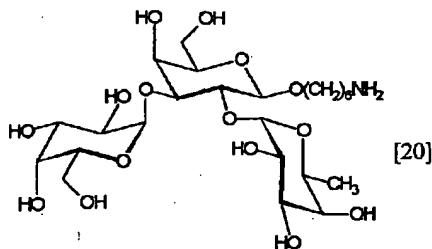
得られた化合物のIRスペクトルを図2に示す。

【0205】実施例7. 実施例4で得られた化合物[17]  $1.8\text{g}$ をメタノール $144\text{ml}$ に溶解し、それに28%ナトリウムメトキシド $540\mu\text{l}$ を加えた後、室温で一夜攪拌し、更に25%アンモニア水 $48\text{ml}$ を加えて室温で3日間攪

拌した。反応液を酢酸で中和し、減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:クロロホルム:メタノール:酢酸:水=6:4:0.5:0.5)で精製し、溶出画分を減圧濃縮した。残渣をゲル濃過カラム(溶離液:メタノール)で精製して化合物[20]

【0206】

【化52】



【0207】 $600\text{mg}$ を得た(収率: 60.3%)。

尚、 $^1\text{H-NMR}$ により、目的化合物が得られたことを確認した。

元素分析  $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{NO}_6$  (587.62)として

計算値(%) : C:49.06, H:7.72, N:2.38,

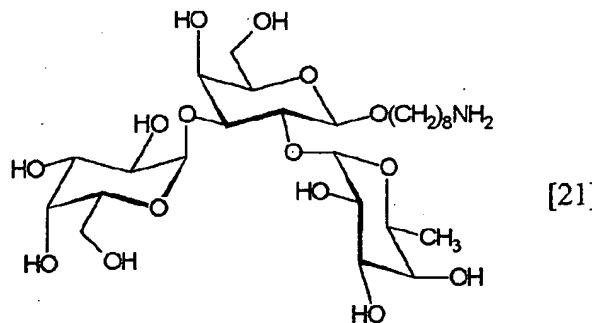
実測値(%) : C:49.08, H:7.72, N:2.42,

得られた化合物のIRスペクトルを図3に示す。

【0208】実施例8. 実施例5で得られた化合物[18]  $56.2\text{mg}$ をメタノール $4\text{ml}$ に溶解し、それに28%ナトリウムメトキシド $15\mu\text{l}$ を加えた後、室温で一夜攪拌し、陽イオン交換樹脂を用いて中和した。陽イオン交換樹脂を濾去した後、反応液をメタノール $4\text{ml}$ に溶解し、これに酢酸ヒドラジン $730\text{mg}$ を加え、還流下で1時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、それにジメチルホルムアミド(DMF)を加えて懸濁させ、反応液中の不溶物を濾去し、濾液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラム(溶離液:クロロホルム:メタノール:酢酸:水=6:4:0.5:0.5)で精製して化合物[21]

【0209】

【化53】



【0210】20mgを得た(收率: 65.1%)。尚、<sup>1</sup>H-NMRにより、目的化合物が得られたことを確認した。

元素分析 C<sub>21</sub>H<sub>41</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub> (615.67)として

計算値(%) : C:50.72, H:8.02, N:2.28,

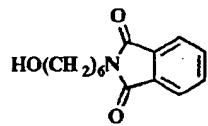
実測値(%) : C:50.69, H:8.09, N:2.33,

得られた化合物のIRスペクトルを図4に示す。

【0211】実施例9. (1) 6-アミノ-1-ヘキサノール 234gをDMF 1Lに溶解し、無水フタル酸296gとビリジン500mLを添加した。120°Cで1時間攪拌した後、無水酢酸2Lを添加した。120°Cで更に2時間攪拌した後、反応液を減圧濃縮した。残渣を酢酸エチルに溶解し、0.2N-塩酸、飽和重曹水、食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去した後、残渣をメタノール4Lに溶解し、28%ナトリウムメトキシド25mLを添加した。室温で4時間攪拌した後、陽イオン交換樹脂を用いて中和した。陽イオン交換樹脂を濾去し、溶媒を留去した後、ヘキサンで結晶化させ、化合物[22]

【0212】

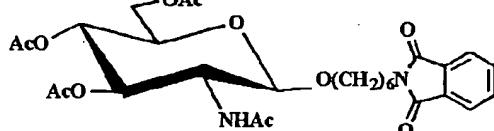
【化54】



[22]

30

\*



[23]

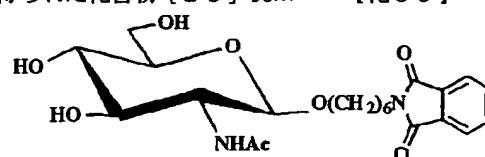
【0217】335gを得た(收率: 59.2%)。

元素分析 C<sub>22</sub>H<sub>43</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub> (576.60)として

計算値(%) : C:58.33, H:6.29, N:4.86

実測値(%) : C:58.01, H:6.99, N:4.87

【0218】(3) (2) で得られた化合物[23] 36※



[24]

【0220】260gを得た(收率: 90.6%)。

元素分析 C<sub>22</sub>H<sub>43</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub> (576.60)として

※ 7gをメタノール6Lに溶解し、28%ナトリウムメトキシド20mLを添加した。室温で4時間攪拌反応させ後、析出

した結晶を濾取し、化合物[24]

【0219】

【化56】

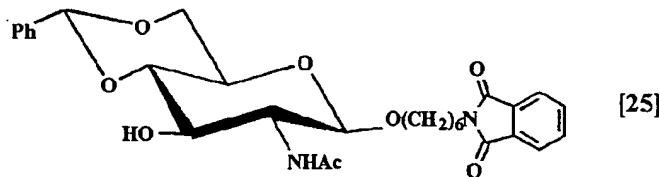
計算値(%) : C:58.66, H:6.71, N:6.22

50 実測値(%) : C:58.65, H:6.74, N:6.20

49

【0221】(4) (3)で得られた化合物 [24] 26.0gをDMF 5 Lに懸濁し、ベンズアルデヒドジメチルアセタール430ml、及びp-トルエンスルホン酸15gを添加した。室温で16時間攪拌反応させた後、28%ナトリウムメ\*

\*トキシド15mlで中和した。反応液を水に投入した後、析出した結晶を濾取し、化合物 [25]  
【0222】  
【化57】



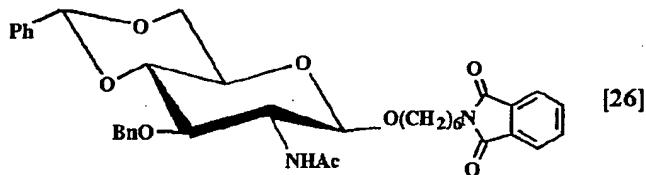
【0223】270gを得た(收率: 87.1%)。

元素分析  $C_{19}H_{24}N_2O_6$  (538.60)として  
計算値(%) : C:64.67, H:6.36, N:5.20  
実測値(%) : C:64.77, H:6.33, N:5.20

【0224】(5) (4)で得られた化合物 [25] 25.0gをDMF 4.5 Lに溶解し、60%水素化ナトリウム28g、※

※及びベンジルブロミド83mlを添加した。室温で18時間攪拌反応させた後、メタノールを添加し、30分間攪拌した。反応液を水に投入した後、析出した結晶を濾取し、化合物 [26]

【0225】  
【化58】

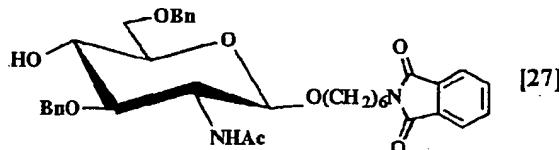


【0226】260gを得た(收率: 89.4%)。

元素分析  $C_{19}H_{24}N_2O_6$  (628.72)として  
計算値(%) : C:68.77, H:6.41, N:4.46  
実測値(%) : C:68.70, H:6.46, N:4.44

【0227】(6) (5)で得られた化合物 [26] 22.0g、シアノ水素化ホウ素ナトリウム200g、及びモレキュラーシーブス3A220gをTHF3Lに懸濁し、氷浴で冷却下飽和塩化水素ジエチルエーテル溶液700mlを30分間で滴下した。氷浴中で更に1時間攪拌反応させた後、クロロホルムで反応液を希釈した。不溶物を濾去し、濾液を飽和重曹水、食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去した後、熱エタノールより再結晶化を行い、化合物 [27]

【0228】  
【化59】

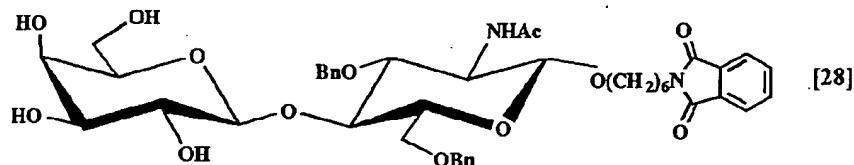


★【0229】78gを得た(收率: 35.3%)。

元素分析  $C_{19}H_{24}N_2O_6$  (630.74)として  
計算値(%) : C:68.55, H:6.71, N:4.44  
実測値(%) : C:68.60, H:6.68, N:4.41

【0230】(7) (6)で得られた化合物 [27] 78.0g、テトラアセチルガラクトシルブロミド153g、及びモレキュラーシーブス4A125gをジクロロメタン1.3Lに溶解し、氷浴で冷却下、トリフルオロメタンスルホン酸銀10.0gのトルエン溶液700ml、2,4,6-トリメチルビリジン25mlを添加した。反応液を更に氷浴下で2時間攪拌反応させた後、不溶物を濾去した。濾液を、0.2N-塩酸、飽和重曹水、食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去した後、残渣をメタノール4Lに溶解し、28%ナトリウムメトキシド8mlを添加し、室温で16時間攪拌反応させた後、陽イオン交換樹脂を用いて中和した。陽イオン交換樹脂を濾去し、反応液を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:クロロホルム:メタノール=9:1)で精製して化合物 [28]

【0231】  
【化60】



【0232】83.4gを得た(收率: 85.0%)。

尚、<sup>1</sup>H-NMRにより、目的化合物が得られたことを確

認した。

50 元素分析  $C_{21}H_{28}N_2O_8$  (792.88)として

51

計算値(%) : C:63.62, H:6.61, N:3.53

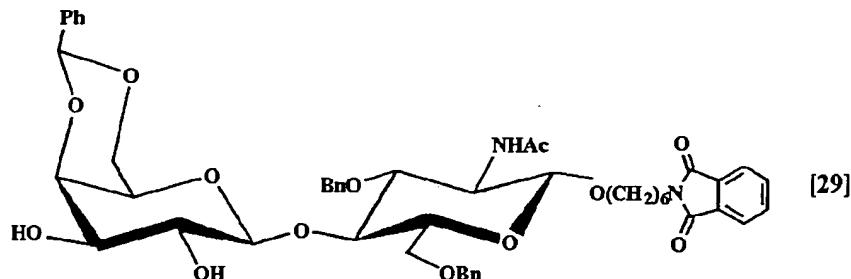
実測値(%) : C:63.55, H:6.62, N:3.60

【0233】実施例10. 実施例9で得られた化合物

[28] 83.4gをベンズアルデヒド830mlに懸濁し、塩化

亜鉛83gを添加し、室温で4時間攪拌反応させ、クロロホ

ルムで反応液を希釈した。反応液を食塩水、飽和重曹 \*

【0235】101gを定量的に得た。尚、<sup>1</sup>H-NMRにより、目的化合物が得られたことを確認した。元素分析 C<sub>49</sub>H<sub>62</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub> (880.99)として

計算値(%) : C:66.80, H:6.41, N:3.18

実測値(%) : C:66.89, H:6.50, N:3.10

【0236】実施例11. 実施例10で得られた化合物 20

[29] 101gをピリジン200mlに溶解し、氷浴で冷却

下、ベンゾイルシアニド30gのアセトニトリル溶液30ml \*

\* 水、食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去した後、ジエチルエーテルより結晶化を行い、化合物 [29]

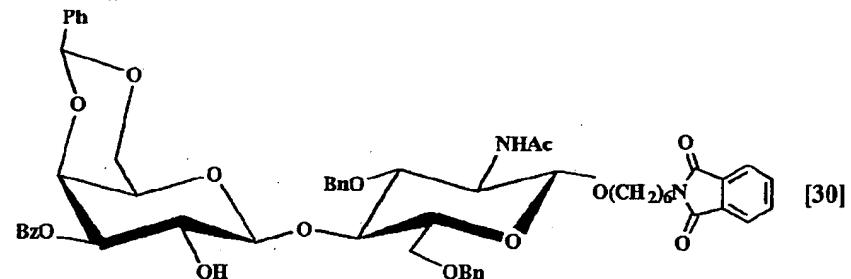
【0234】

【化61】

※を添加し、冷却下で4時間攪拌反応させた後、クロロホルムで反応液を希釈した。反応液を食塩水、0.2N-塩酸、飽和重曹水、食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去し、反応液を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラム（溶離液：クロロホルム）で精製して化合物 [30].

【0237】

【化62】

【0238】76.7gを得た(收率: 74.0%)。尚、<sup>1</sup>H-NMRにより、目的化合物が得られたことを確認した。元素分析 C<sub>51</sub>H<sub>64</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub> (985.10)として

計算値(%) : C:68.28, H:6.14, N:2.84

実測値(%) : C:68.30, H:6.15, N:2.82

【0239】実施例12. 実施例11で得られた化合物

[30] 75g、メチル2,3,4-トリ-O-ベンジル-1-チオフ

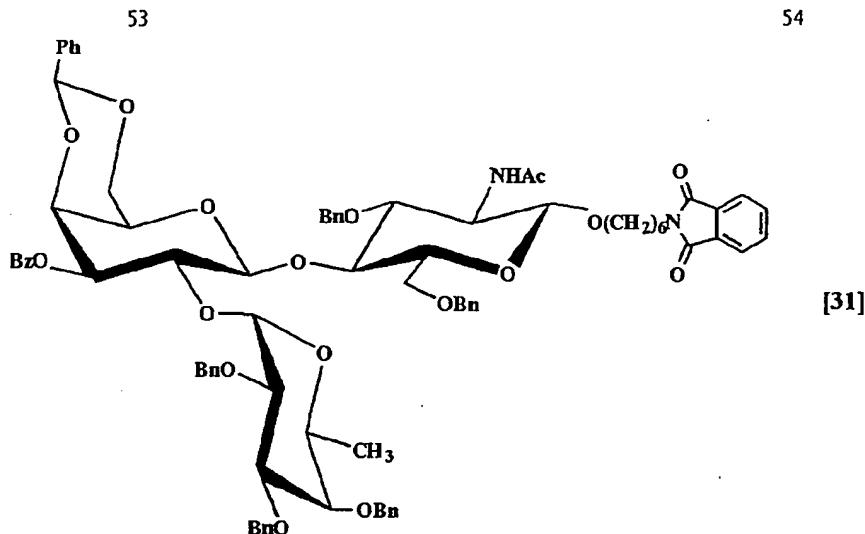
コース106g、及びモレキュラーシーブス4A200gを1,2-ジ

クロロエタン/DMF=5/1混液1.5Lに懸濁し、臭化銅(I)

I)76g、テトラブチルアンモニウムプロミド122gを添加し、反応液を室温で48時間攪拌反応させた後、不溶物を濾去した。濾液を、0.2N-塩酸、飽和重曹水、食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去し、反応液を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラム（溶離液：クロロホルム）で精製して化合物 [31].

【0240】

【化63】



【0241】78.6gを得た(收率; 73.7%)。尚、<sup>1</sup>H-NMRにより、目的化合物が得られたことを確認した。

元素分析 C<sub>43</sub>H<sub>64</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub> (1401.61)として

計算値(%) : C:71.13, H:6.33, N:2.00

実測値(%) : C:71.31, H:6.50, N:1.97

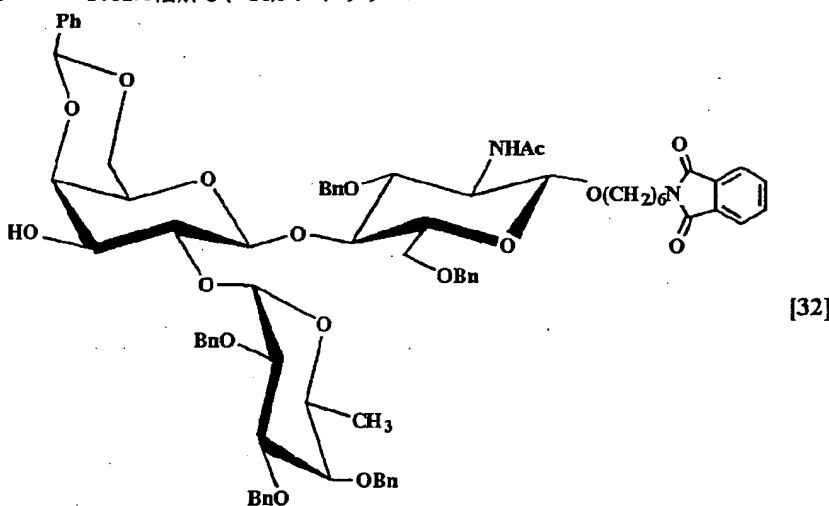
【0242】実施例13. 実施例12で得られた化合物

【31】67gをメタノール2.6Lに溶解し、28%ナトリウムメトキシド20mlを添加し、室温で4時間攪拌反応させた後、酢酸を用いて中和した。反応液を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:クロロホルム)で精製して化合物【32】を得た。

\* ムメトキシド20mlを添加し、室温で4時間攪拌反応させた後、酢酸を用いて中和した。反応液を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:クロロホルム)で精製して化合物【32】

【0243】

【化64】



【0244】45gを得た(收率; 72.4%)。尚、<sup>1</sup>H-NMRにより、目的化合物が得られたことを確認した。

元素分析 C<sub>42</sub>H<sub>62</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub> (1297.51)として

計算値(%) : C:70.35, H:6.53, N:2.16

実測値(%) : C:70.39, H:6.50, N:2.11

【0245】実施例14. 実施例13で得られた化合物

【32】23g, 2-アジド-2-デオキシ-3,4,6-トリ-O-アセチルガラクトシルプロミド21g, 及びモレキュラーシーアクション4A70gをジクロロメタン1Lに懸濁し、臭化水銀39g, シアン化水銀27gを添加した。反応液を室温で48時間攪拌反応させた後、不溶物を濾去した。濾液を、よう化カリウム水溶液、飽和重曹水、食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去した後、残渣をメタノール2Lに溶解し、28%ナトリウムメトキシド10mlを添加し、室温で16時間攪拌反応させた後、陽イオン交換樹脂を用いて中和した。陽イオン交換樹脂を濾去し、反応液を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:クロロホルム:メタノール=100:3)で精製して化合物【33】を得た。

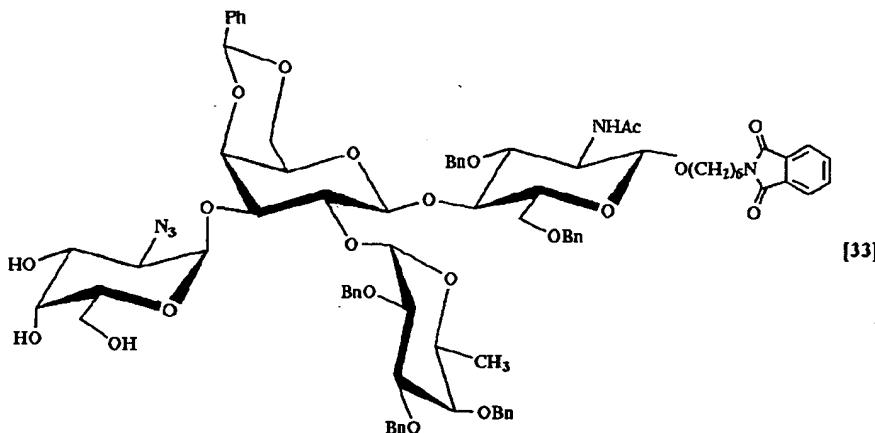
リウム水溶液、飽和重曹水、食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去した後、残渣をメタノール2Lに溶解し、28%ナトリウムメトキシド10mlを添加し、室温で16時間攪拌反応させた後、陽イオン交換樹脂を用いて中和した。陽イオン交換樹脂を濾去し、反応液を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:クロロホルム:メタノール=100:3)で精製して化合物【33】

【0246】

【化65】

【0246】実施例14. 実施例13で得られた化合物

【32】23g, 2-アジド-2-デオキシ-3,4,6-トリ-O-アセチルガラクトシルプロミド21g, 及びモレキュラーシーアクション4A70gをジクロロメタン1Lに懸濁し、臭化水銀39g, シアン化水銀27gを添加した。反応液を室温で48時間攪拌反応させた後、不溶物を濾去した。濾液を、よう化カリウム水溶液、飽和重曹水、食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去した後、残渣をメタノール2Lに溶解し、28%ナトリウムメトキシド10mlを添加し、室温で16時間攪拌反応させた後、陽イオン交換樹脂を用いて中和した。陽イオン交換樹脂を濾去し、反応液を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:クロロホルム:メタノール=100:3)で精製して化合物【33】を得た。



【0247】16gを得た(收率: 59.5%)。尚、<sup>1</sup>H-NMRにより、目的化合物が得られたことを確認した。

元素分析 C<sub>62</sub>H<sub>83</sub>N<sub>3</sub>O<sub>21</sub> (1484.66)として

計算値(%) : C:66.34, H:6.31, N:4.72

実測値(%) : C:66.35, H:6.37, N:4.70

【0248】実施例15. 実施例14で得られた化合物

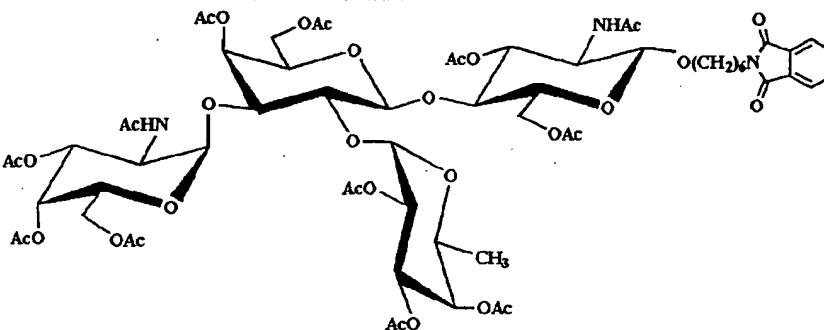
【33】13.7gを酢酸320mlに溶解し、10%パラジウム

炭素13gを添加した。反応容器を水素ガス置換し、室温 20 【化66】

で72時間攪拌反応させた後、不溶物を濾去した。溶媒を\*

\* 留去した後、残渣をピリシン250mlに溶解し、無水酢酸250mlを添加し、室温で16時間攪拌反応させた後、反応液を減圧濃縮した。残渣を、0.2N-塩酸、飽和重曹水、食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:クロロホルム:メタノール=100:3)で精製して化合物【34】

【0249】



【0250】8gを得た(收率: 63.4%)。尚、<sup>1</sup>H-NMRにより、目的化合物が得られたことを確認した。

元素分析 C<sub>62</sub>H<sub>83</sub>N<sub>3</sub>O<sub>21</sub> (1382.34)として

計算値(%) : C:53.87, H:6.05, N:3.04

実測値(%) : C:53.88, H:6.03, N:3.02

【0251】実施例16. 実施例15で得られた化合物

【34】7.7gをメタノール500mlに溶解し、28%ナトリ

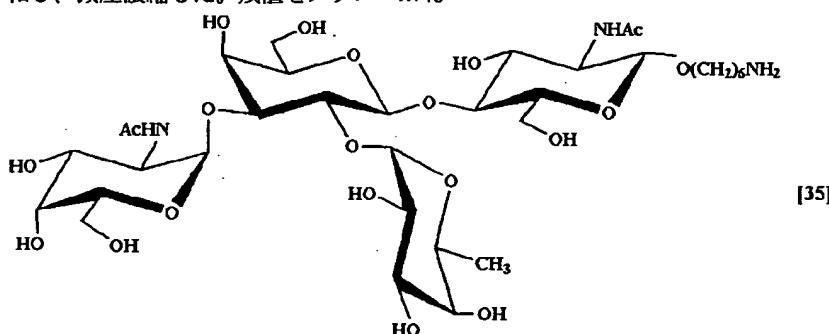
ウムメトキシド1mlを添加し、室温で24時間攪拌反応さ

せた後、酢酸で中和し、減圧濃縮した。残渣をメタノール40

メル400mlに溶解し、酢酸ヒドラジン74gを添加した後、還流下で4時間攪拌反応させた。反応液を減圧濃縮し、残渣をDMFを加えて懸濁させ、不溶物を濾去した。濾液を減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:クロロホルム:メタノール:酢酸:水=10:10:1:2)で精製して化合物【35】

【0252】

【化67】



【0253】3.2gを得た(收率: 63.4%)。元素分析

$C_{14}H_{21}N_3O_6$  (831.87)として

計算値(%) : C:49.09, H:7.39, N:5.05

実測値(%) : C:49.10, H:7.40, N:5.10

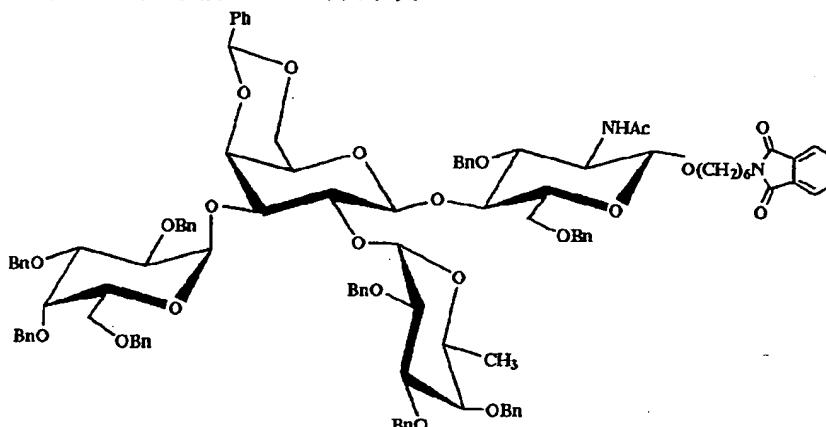
得られた化合物の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを図5に示す。

【0254】実施例17. 実施例12で得られた化合物

【32】20g、エチル2,3,4,6-テトラ-O-ベンジル-1-チ

オガラクトース27g、及びモレキュラーシーブス4A45gを

1,2-ジクロロエタン/DMF=5/1混液300mlに懸濁し、臭\*



【0256】16.5gを得た(收率: 58.7%)。尚、<sup>1</sup>H-NMRにより、目的化合物が得られたことを確認した。

元素分析  $C_{14}H_{21}N_3O_6$  (831.87)として

計算値(%) : C:49.09, H:7.39, N:5.05

実測値(%) : C:49.10, H:7.40, N:5.10

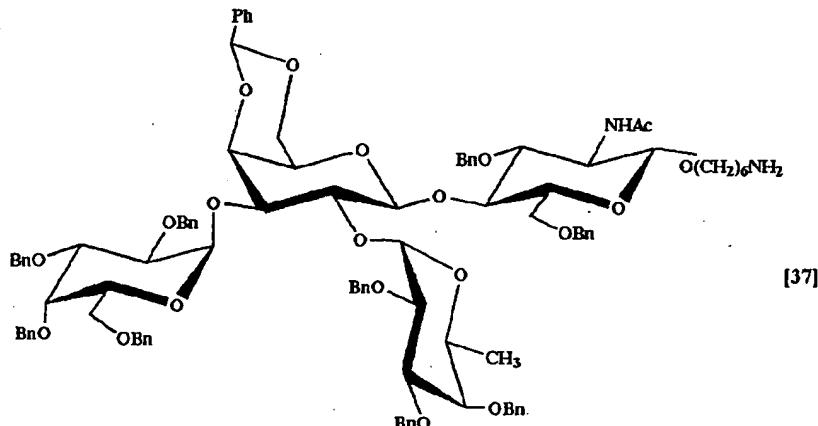
【0257】実施例18. 実施例17で得られた化合物

【36】18.4gをメタノール700mlに溶解し、酢酸ヒドラ※

\* 化銅(II)16g、テトラブチルアンモニウムプロミド25gを添加した。反応液を室温で72時間攪拌反応させた後、不溶物を濾去した。濾液を、0.2N-塩酸、飽和重曹水、食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:クロロホルム)で精製して化合物【36】

【0255】

【化68】



【0259】16.4gを得た(收率: 96.1%)。尚、<sup>1</sup>H-NMRにより、目的化合物が得られたことを確認した。

元素分析  $C_{14}H_{21}N_3O_6$  (1690.04)として

計算値(%) : C:72.49, H:6.92, N:1.66

実測値(%) : C:72.51, H:6.88, N:1.67

【0260】実施例19. 実施例18で得られた化合物

16gを酢酸500mlに溶解し、10%パラジウム炭素16gを添

加した。反応容器を水素ガス置換し、室温で72時間攪拌反応させた後、不溶物を濾去した。溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:クロロホルム:メタノール=9:1)で精製して化合物【38】

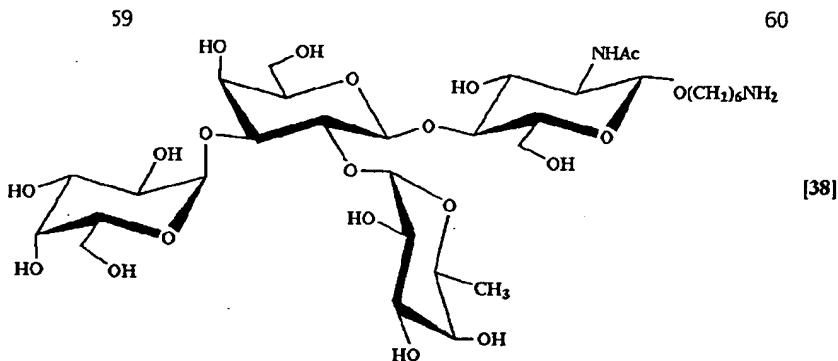
【0258】

【化69】

加した。反応容器を水素ガス置換し、室温で72時間攪拌反応させた後、不溶物を濾去した。溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラム(溶離液:クロロホルム:メタノール:酢酸:水=10:10:1:2)で精製して化合物【38】

【0261】

【化70】



【0262】7gを得た(収率: 88.7%)。

元素分析  $C_{12}H_{20}N_2O_6$  (790.81)として

計算値(%) : C:48.60, H:7.39, N:3.54

実測値(%) : C:48.61, H:7.40, N:3.57

得られた化合物の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを図6に示す。

【0263】<感作粒子凝集法による血液型の判定>

実施例20.

(1) ヒトA型抗原糖鎖感作リポソーム試薬の調製

オクタデシルエイコサン酸 0.18mmol, N-ヒドロキシサクシミド 0.22mmol及びジシクヘキシリカルボジミド 0.22mmolをクロロホルム 2.5mlに溶解し、室温で2時間反応させた。反応液をクロロホルム 50mlで希釈し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮した。残渣をDMF 3mlに溶解し、実施例2で得られた化合物【11】 0.18mmolを加え室温で2時間攪拌した。反応液を濃縮後、残渣をシリカゲルカラム(溶離液: クロロホルム: メタノール=5:1→2:1)で精製して糖脂質を得た。得られた糖脂質 0.157μmol、1. ジバルミトイロホスファチジルコリン 14.2μmol、ジバルミトイロホスファチジルグリセロール 1.57μmol及びコレステロール 15.7μmolをクロロホルム/ジクロロメタン=1/4混液 5mlに溶解し、200rpm攪拌下、100mM FD&C Red No.40(和光純薬工業(株)製)の水溶液 10mlを滴下し、250rpmで2時間攪拌してリポソーム化した後、沸騰水中に10分間置いて有機溶媒を完全に除去し、生理食塩水で遠心洗浄して、ヒトA型抗原と同じ抗原性を有する糖鎖化合物が表面に固定化された平均粒径10μmの赤色色素内包リポソームを得た。これを生理食塩水で適当に希釈したものヒトA型抗原糖鎖感作リポソーム試薬とした。

【0264】(2) 血液型の判定

上記(1)で得られたリポソームに生理食塩水を加えて4v/v%としたリポソーム液を50μlずつ取り、これに抗A血清及び抗B血清を夫々 50μlずつ混合させた。その結果、抗B血清の添加では凝集は認められなかったが、抗A血清の添加ではリポソームの凝集が目視で確認できた。抗B血清を添加したリポソーム液の様子を図7、抗A血清を添加したリポソーム液の様子を図8に示す。

【0265】実施例21.

(1) 抗人赤血球ウサギFab'-POD-A型糖鎖抗原複合体の

### 作製

ペルオキシダーゼ(以下PODと略記する。)(東洋紡績(株)製) 30mgを1mlの50mM磷酸緩衝液(pH7.5)に溶解した。これに、ジメチルスルホキシドに溶解したスルホスクニミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート(Sulfo-SMPB(ピアス(株)製)) 5mgを添加し5°Cで2時間放置した。次いでこれに、実施例16で得られた化合物【35】(A型糖鎖抗原誘導体) 30mg、水溶性カルボジイミド(以下、WSCと略記する。) 10mgを更に添加し室温で4時間放置して、POD上に化合物を固定化した後、ゲル濾過カラム(Superdex200(アマシャム・ファルマシアバイオテック(株)製), 50mM PBS pH6.0)で目的物を精製した。精製された目的物と、抗人赤血球ウサギ抗体(ICN社製)を常法によりFab'としたもの(添加したPODと等モル)とを5°Cで一晩放置して反応させた。この溶液をゲル濾過カラム(Superdex200(アマシャム・ファルマシアバイオテック(株)製), 50mM PBS pH6.0)で精製し抗人赤血球ウサギFab'-POD-A型糖鎖抗原複合体(以下、Fab'-POD-Aと略記する。) 3.2mgを得た。尚、これを赤血球と反応させて赤血球上に感作することにより、ヒト血液型裏試験用試薬とすることができます。

【0266】(2) 抗人赤血球ウサギFab'-POD-B型糖鎖抗原複合体の作製

POD(東洋紡績(株)製) 30mgを1mlの50mM磷酸緩衝液(pH7.5)に溶解した。これに、ジメチルスルホキシドに溶解したSulfo-SMPB(ピアス(株)製) 5mgを添加し5°Cで2時間放置した。次いでこれに、実施例19で得られた化合物【38】(B型糖鎖抗原誘導体) 30mg、WSC 10mgを更に添加し室温で4時間放置して、POD上に実施例19で得られた化合物【38】を固定化した後、ゲル濾過カラム(50mM PBS pH6.0)で目的物を精製した。精製された目的物と、抗人赤血球ウサギ抗体(ICN社製)を常法によりFab'としたもの(添加したPODと等モル)とを5°Cで一晩放置して反応させた。この溶液をゲル濾過カラム(Superdex200(アマシャム・ファルマシアバイオテック(株)製), 50mM PBS pH6.0)で精製し抗人赤血球ウサギFab'-POD-B型糖鎖抗原複合体(以下、Fab'-POD-Bと略記する。) 3.6mgを得た。尚、この複合体は、ヒト血液型判定用試薬として有用なものである。

る。即ち、これを赤血球と組み合わせて用いることによりヒト血液型を容易に判定し得る。

### 【0267】(3) 血液型の判定

O型赤血球を3%含有する抗A抗体溶液(和光純薬工業(株)製、凝集価1024倍(試験管法))50μlに、実施例27で得られたFab'-POD-A 7μMを混合すると強い凝集が目視で確認できた。また、Fab'-POD-Aの代わりに、実施例28で得られたFab'-POD-B 7μMを混合した場合は凝集は確認されなかった。逆に、O型赤血球を3%含有する抗B抗体溶液(和光純薬工業(株)製、\*10

凝集判定		抗A希釈倍率	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560
スライド法	A型血球	4+	4+	4+	3+	2+	1+	W	-	-	-
スライド法	B型血球	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fab'	-POD-A	4+	4+	3+	2+	1+	1+W	W	-	-	-
Fab'	-POD-B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

凝集判定		抗B希釈倍率	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560
スライド法	A型血球	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
スライド法	B型血球	4+	4+	3+	2+	1+	W	-	-	-	-
Fab'	-POD-A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fab'	-POD-B	4+	4+	3+	2+	1+	W	-	-	-	-

【0269】尚、O型赤血球を3%含有する抗A(又はB)抗体溶液の代わりに、約3%の赤血球を含むヒト血清を用いて同様の検討を行ったところ、A型の血清では、Fab'-POD-Bとの反応により凝集が生じたが、Fab'-POD-Aとの反応では凝集は生じなかった。また、B型の血清では、Fab'-POD-Aとの反応により凝集が生じたが、Fab'-POD-Bとの反応では凝集は生じなかった。

【0270】以上の結果から、本発明の糖鎖化合物を用いることにより、ヒト血液型の判定を容易に行なうことが出来るようになることが判る。

### 【0271】

【発明の効果】本発明は、置換基を有していてもよいアミノ基が二価の炭化水素残基を介して結合した糖鎖化合物、該糖鎖化合物が固定化された担体及びヒト血液型抗原感作粒子、該糖鎖化合物を含んで成るヒト血液型判定用試薬及び該糖鎖化合物を用いたヒト血液型の判定方法を提供するものであり、本発明の糖鎖化合物は従来直接結合させることができなかった、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、アシリオキシカルボニル基、ハロホルミル基、クロロスルホニル基、シアネート基、エポキシ基、ケトン基、アルデヒド基等を有する担体等と容易に結合させることができるため、該糖鎖化合物がヒト血液型抗原と同じ抗原部位を含んで成る場合には、対応

20 の抗体を製造するための免疫源として使用することができ、また、本発明の糖鎖化合物を利用して糖鎖化合物自体或いはその抗体の存在を確認すること、即ち本発明の糖鎖化合物をヒト血液型判定用試薬として用いることにより、ヒト血液型の判定を、バイオハザードの問題等を生じさせることなく容易に行なうことができる。

### 【0272】

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】実施例2で得られた化合物[11]のIRスペクトル。

30 【図2】実施例6で得られた化合物[19]のIRスペクトル。

【図3】実施例7で得られた化合物[20]のIRスペクトル。

【図4】実施例8で得られた化合物[21]のIRスペクトル。

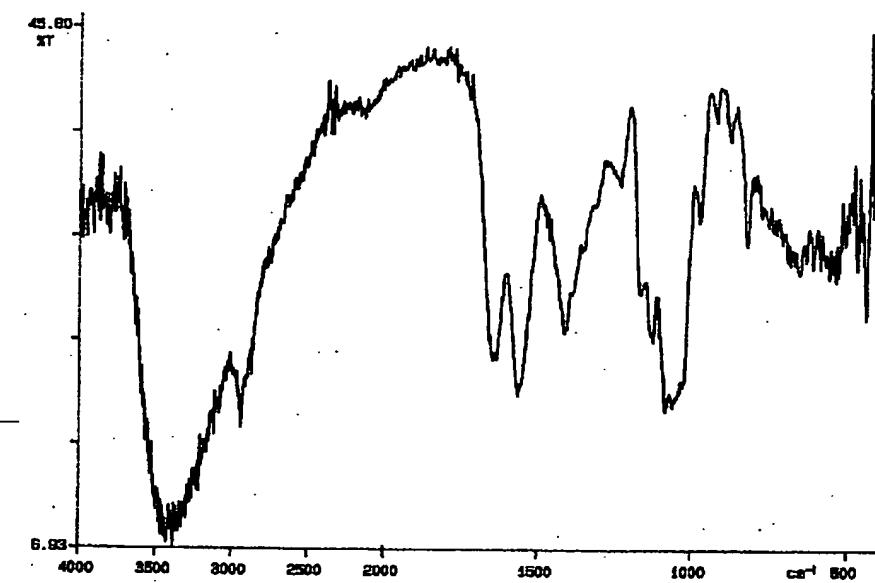
【図5】実施例16で得られた化合物[35]の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル。

【図6】実施例19で得られた化合物[38]の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル。

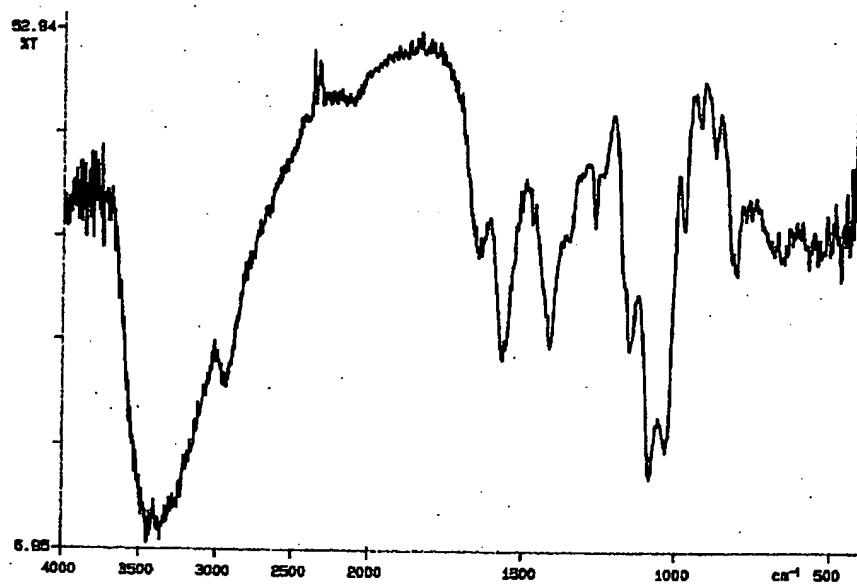
40 【図7】実施例21で得られた抗B血清を添加したリボソーム液の顕微鏡写真。

【図8】実施例21で得られた抗A血清を添加したリボソーム液の顕微鏡写真。

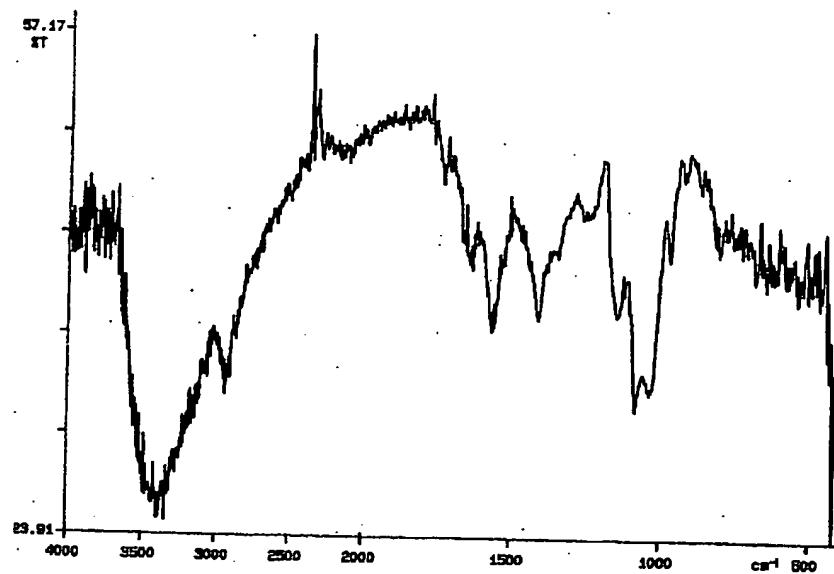
【図1】



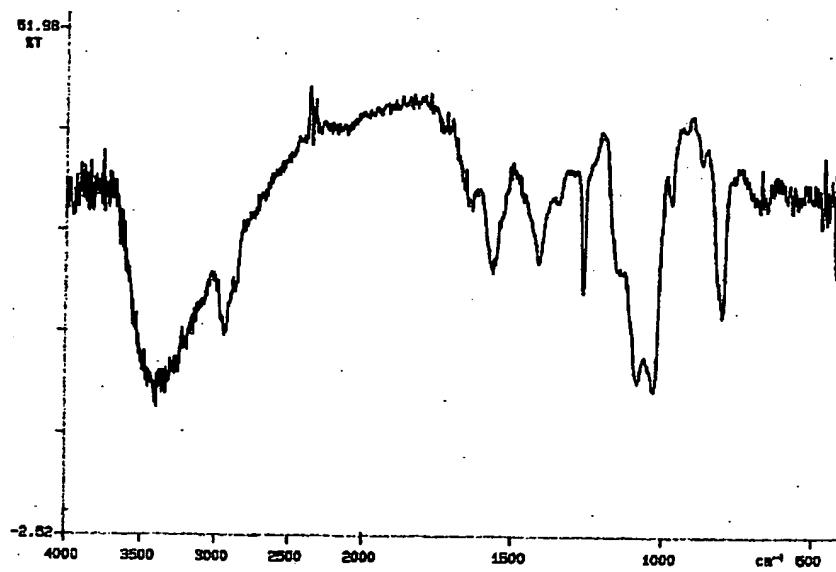
【図2】



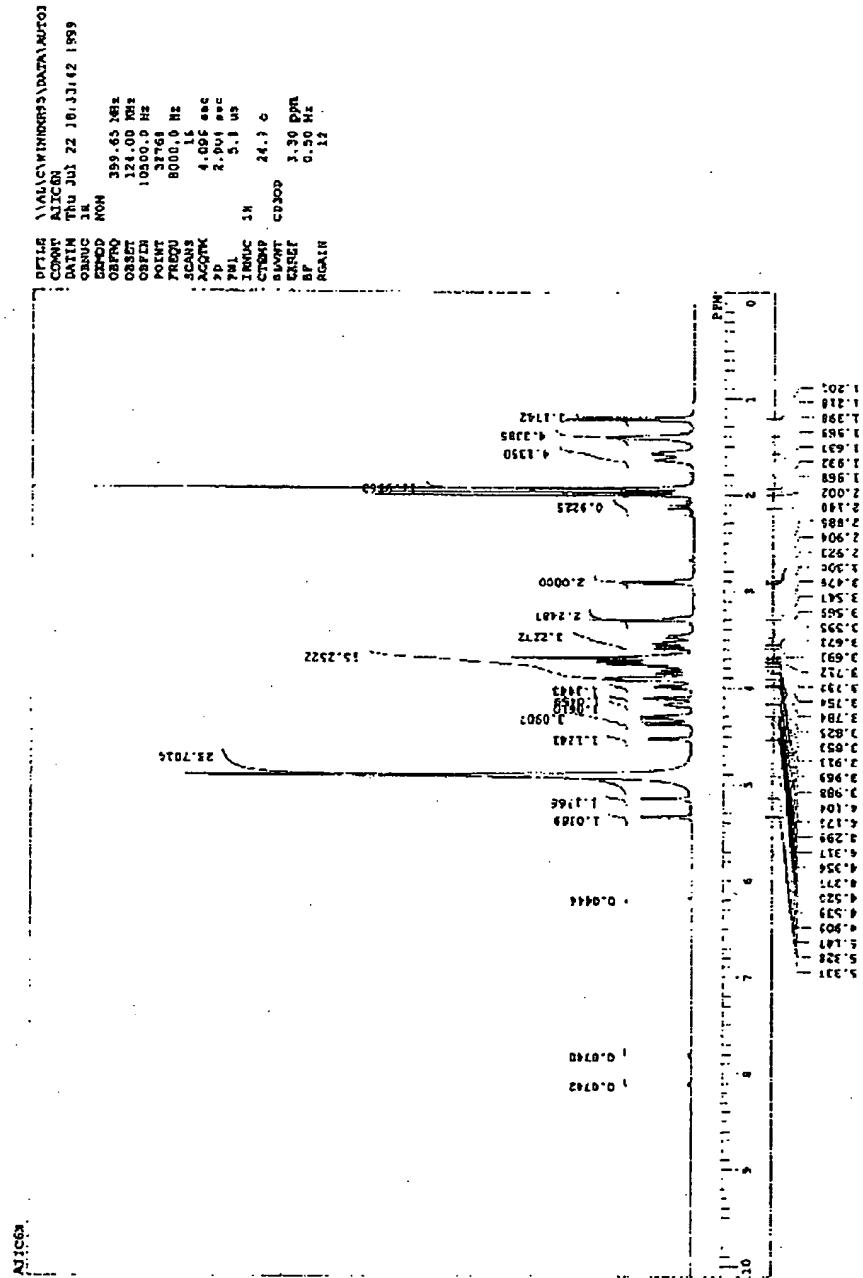
【図3】



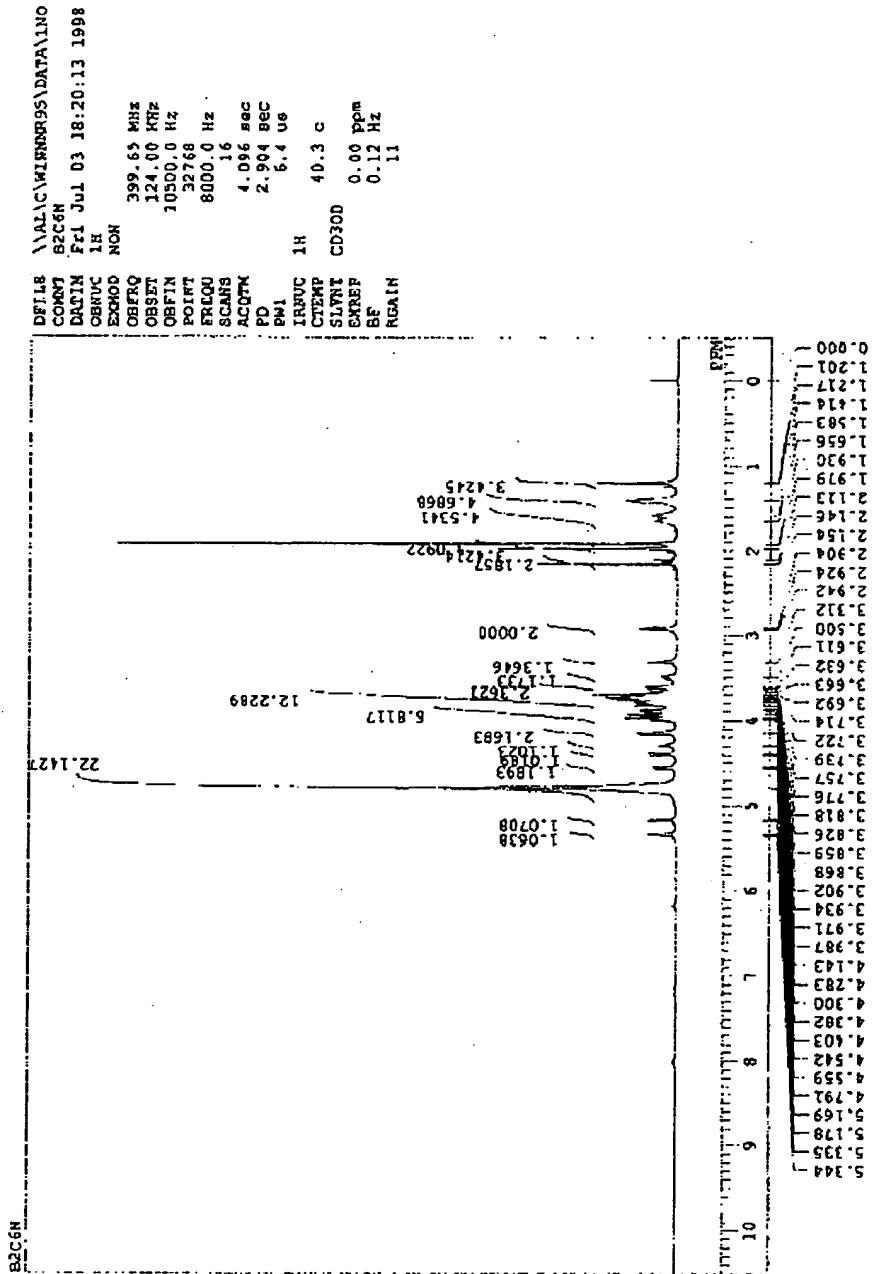
【図4】



【图5】



【図6】

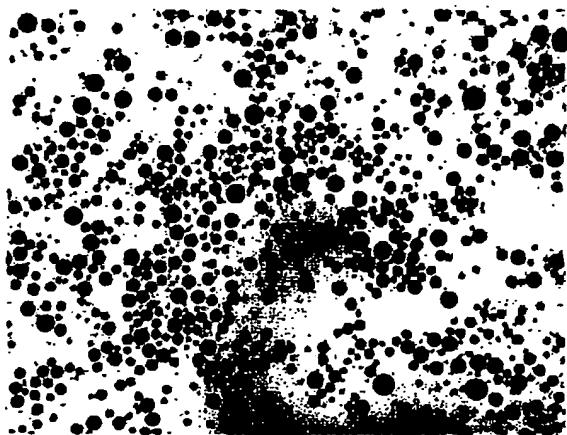


**BEST AVAILABLE COPY**

(37)

特開2001-89494

【図7】



【図8】



---

フロントページの続き

Fターム(参考) 2G045 AA09 CA25 DA30 FB03  
4C057 BB03 BB04 CC03 DD03 JJ09  
4C085 AA08 BB21 CC33 DD51 GG10